

# APPARATUS AND METHOD FOR PERFORMING MICROFLUIDIC MANIPULATIONS FOR CHEMICAL ANALYSIS AND SYNTHESIS

**Publication number:** DE69528705 (T2)

**Publication date:** 2003-07-03

**Inventor(s):** RAMSEY MICHAEL [US]

**Applicant(s):** UT BATTELLE LLC [US]

**Classification:**

**- international:** **G01N33/50; B01F13/00; B01J19/00; B01L3/00; C07B61/00; C12Q1/68; G01N27/447; G01N30/16; G01N30/60; G01N37/00; G05D11/02; B29C65/00; B29C65/48; G01N30/02; G01N30/28; G01N30/38; G01N30/84; G01N33/50; B01F13/00; B01J19/00; B01L3/00; C07B61/00; C12Q1/68; G01N27/447; G01N30/00; G01N37/00; G05D11/00; B29C65/00; B29C65/48; (IPC1-7): G01N27/00; B01L3/00; G01N27/26; G01N27/447**

**- European:** B01F13/00M2A; B01F13/00M6A; B01J19/00R; B01L3/00C6M; G01N27/447B4; G01N27/447C5; G01N27/447C7; G01N30/16; G01N30/60M

**Application number:** DE19956028705T 19950801

**Priority number(s):** US19940283769 19940801; WO1995US09492 19950801

**Also published as:**

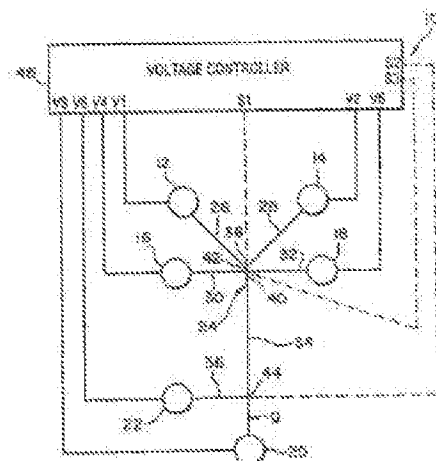
WO9604547 (A1)  
US5858195 (A)  
US6342142 (B1)  
US6001229 (A)  
MX9700845 (A)

[more >>](#)

Abstract not available for DE 69528705 (T2)

Abstract of corresponding document: **WO 9604547 (A1)**

A microchip laboratory system (10) and method provide fluidic manipulations for a variety of applications, including sample injection for microchip chemical separations. The microchip is fabricated using standard photolithographic procedures and chemical wet etching, with the substrate and cover plate joined using direct bonding. Capillary electrophoresis and electrochromatography are performed in channels (26, 28, 30, 32, 34, 36, 38) formed in the substrate. Analytes are loaded into a four-way intersection of channels by electrokinetically pumping the analyte through the intersection (40), followed by a switching of the potentials to force an analyte plug into the separation channel (34).



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑨7 EP 0 775 306 B 1

⑩ DE 695 28 705 T 2

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 27/00**  
G 01 N 27/26  
G 01 N 27/447  
B 01 L 3/00

DE 695 28 705 T 2

- |    |   |                |
|----|---|----------------|
| ②1 | Deutsches Aktenzeichen:                               | 695 28 705.2   |
| ⑧6 | PCT-Aktenzeichen:                                     | PCT/US95/09492 |
| ⑨6 | Europäisches Aktenzeichen:                            | 95 927 492.9   |
| ⑧7 | PCT-Veröffentlichungs-Nr.:                            | WO 96/004547   |
| ⑧6 | PCT-Anmeldetag:                                       | 1. 8. 1995     |
| ⑧7 | Veröffentlichungstag<br>der PCT-Anmeldung:            | 15. 2. 1996    |
| ⑨7 | Erstveröffentlichung durch das EPA:                   | 28. 5. 1997    |
| ⑨7 | Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA: | 30. 10. 2002   |
| ④7 | Veröffentlichungstag im Patentblatt:                  | 3. 7. 2003     |

③0 Unionspriorität:

283769 01. 08. 1994 US

⑦3 Patentinhaber:

UT-Battelle, LLC., Oak Ridge, Tenn., US

⑦4 Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,  
NL, PT, SE

⑦2 Erfinder:

RAMSEY, Michael, J., Knoxville, US

⑤4 VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUSFÜHREN VON MIKROFLUIDMANIPULATIONEN FÜR CHEMISCHE  
ANALYSE UND SYNTHES

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 695 28 705 T 2

5 Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Miniaturinstrumente für die chemische Analyse, chemische Messung und Synthese und spezieller elektrisch gesteuerte Manipulationen von Fluiden in mikrotechnisch hergestellten Kanälen. Diese Manipulationen können in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden, einschließlich der elektrisch gesteuerten Manipulation von Fluid für

10 Kapillarelektrophorese, Flüssigchromatographie, Fließinjektionsanalyse und chemische Reaktion und Synthese.

Hintergrund der Erfindung

Laboranalyse ist ein schwieriges Verfahren. Die Erfassung von chemischer und biochemischer Information erfordert teure Ausrüstung, spezialisierte Laboratorien und hochqualifiziertes Personal. Aus diesem Grund werden Laboruntersuchungen nur unter bestimmten Umständen durchgeführt, wo der Erhalt von chemischer Information nützlich ist. Ein großer Anteil an Untersuchungen, sowohl in der Forschung als auch unter klinischen Umständen, wird mit groben manuellen Methoden durchgeführt, die durch hohe Laborkosten, hohen Reagenzienverbrauch, lange Umsetzungszeiten,

15 relative Ungenauigkeit und schlechte Reproduzierbarkeit gekennzeichnet sind. Die Praxis von Techniken, wie Elektroforese, die in der Biologie und in medizinischen Laboratorien weit verbreitet angewendet werden, hat sich in dreißig Jahren nicht wesentlich geändert.

Vorgänge, die bei typischen Laborverfahren durchgeführt werden, umfassen Probenpräparation, chemische/biochemische Umwandlungen, Probenfraktionierung, Signalerfassung und Datenverarbeitung. Um diese Aufgaben zu bewältigen, werden Flüssigkeiten häufig mit volumetrischer Genauigkeit gemessen und verteilt, miteinander gemischt und einer oder mehreren verschiedenen physikalischen oder chemischen Umgebungen ausgesetzt, die eine Umwandlung oder Fraktionierung durchführen. Unter Forschungs-, Diagnostik- oder Entwicklungssituationen werden diese Vorgänge in einem makroskopischen Maßstab durchgeführt, wobei Fluidvolumina im Bereich von wenigen Mikrolitern bis zu mehreren Litern gleichzeitig verwendet werden. Individuelle Vorgänge werden nacheinander durchgeführt, wobei häufig unterschiedliche spezialisierte Ausrüstung und Instrumente für separate Stufen in dem Verfahren verwendet werden. Komplikationen, Schwierigkeiten und Aufwand sind häufig das Ergebnis von Vorgängen, die mehrere Laborverarbeitungsstufen umfassen.

25 30

Viele Arbeitskräfte haben versucht, diese Probleme durch Schaffung integrierter Laborsysteme zu lösen. Herkömmliche Robotereinheiten wurden angepaßt, um Pipettieren, Probenhandhabung, Mischen von Lösungen sowie einige Fraktionierungs- und Erfassungsvorgänge durchzuführen. Jedoch sind diese Einheiten hochkompliziert, sehr teuer und ihr Betrieb erfordert soviel Training, daß ihre Verwendung auf eine relativ geringe Anzahl von Forschungs- und Entwicklungsprogrammen gesteuert war. Erfolgreicher waren automatisierte klinische Diagnostiksysteme zum schnellen und preiswerten Durchführen einer geringen Anzahl von Anwendungen, wie klinischen

35 40

chemischen Tests für die Mengen von Glucose, Elektrolyten und Gasen im Blut. Leider ist solch eine Ausrüstung aufgrund ihrer Komplexität, großen Abmessung und hohen Kosten in ihrer Anwendung auf eine geringe Anzahl diagnostischer Gegebenheiten gesteuert.

Der Wunsch, die Vorteile von integrierten Systemen in einem breiteren Rahmen von Laboranwendungen auszunutzen, führte zu Vorschlägen, solche Systeme zu miniaturisieren. In den 80er Jahren wurde beträchtlicher Forschungs- und Entwicklungsaufwand in eine Untersuchung des Konzepts von Biosensoren investiert mit der Hoffnung, sie könnten den Bedarf erfüllen. Solche Einrichtungen nutzen selektive chemische Systeme oder Biomoleküle, die an neue Erfassungsmethoden gekoppelt sind, wie Elektrochemie und Optiken zur Umwandlung chemischer Signale in elektrische, die von Computern und anderen Signalverarbeitungseinheiten interpretiert werden können. Leider waren Biosensoren eine wirtschaftliche Enttäuschung. Weniger als 20 kommerzialisierte Produkte waren 1993 erhältlich, was Einnahmen in den USA von weniger als \$ 100 Millionen ausmachte. Die meisten Beobachter stimmen darin überein, daß dieser Fehlschlag in erster Linie eher einen technologischen Hintergrund hat, als daß er eine Fehlinterpretation des Marktpotentials widerspiegelt. Tatsächlich würden viele Situationen, wie umfangreiches Screenen nach neuen Arzneimitteln, hochgradig parallele genetische Forschung und Erprobung, Mikrochemie zur Minimierung von kostspieligem Reagenzienverbrauch und Abfallerzeugung sowie Diagnostik am Krankenbett oder in der Arztpraxis in hohem Maße von miniaturisierten integrierten Laborsystemen profitieren.

In den frühen 90er Jahren begann man, die Möglichkeit der Schaffung von Miniaturversionen von herkömmlicher Technologie zu diskutieren. Andreas Manz war einer der ersten, der die Idee in der wissenschaftlichen Presse artikulierte. Indem er sie "miniaturisierte Gesamtanalysesysteme" oder " $\mu$ -TAS" nannte, sagte er voraus, daß es möglich sein würde, mikroskopische Versionen der verschiedenen Elemente, die notwendig sind, chemische oder biochemische Proben zu verarbeiten, in einzelne Einheiten zu integrieren, um dabei ein automatisiertes Experimentieren zu erreichen. Seit dieser Zeit tauchten Miniaturkomponenten auf, insbesondere molekulare Trennverfahren und Mikroventile. Jedoch wurden Versuche, diese Systeme in vollständig integrierte Systeme zu kombinieren, nicht mit Erfolg umgesetzt. Dies liegt in erster Linie daran, daß sich die genaue Manipulation von kleinen Fluidvolumina in extrem engen Kanälen als eine schwierige technologische Hürde erwiesen hat.

Ein hervortretendes Gebiet, das einer Miniaturisierung zugänglich ist, ist die Kapillarelektrophorese. Kapillarelektrophorese wurde eine gängige Technik zur Trennung von geladenen Molekülspezies in Lösung. Die Technik wird in kleinen Kapillarröhrchen durchgeführt, um Bandenverbreiterungseffekte aufgrund von terminaler Konvektion zu verringern und damit die Auflösungsleistung zu verbessern. Die kleinen Röhrchen setzen voraus, daß genaue Volumina von Materialien in der Größenordnung von Nanolitern für die Injektion der Probe in das Trennungskapillarröhrchen gehandhabt werden müssen.

Derzeitige Techniken zur Injektion umfassen Elektromigration und Saugheben von Probe aus einem Behälter in ein kontinuierliches Trennröhrchen. Beide dieser Techniken leiden unter relativ schlechter Reproduzierbarkeit, und Elektromigration leidet zusätzlich unter einem Fehler auf der

Grundlage der elektroforetischen Mobilität. Bei beiden Probentechniken muß das Einlaßende des Analysekapillarröhrchens von einem Pufferreservoir zu einem Reservoir, das die Probe enthält, überführt werden. Daher ist eine mechanische Manipulation involviert. Für die Saughubinjektion wird das Probenreservoir über das Pufferreservoir gehoben, wobei das Ausgangsende der Kapillare für einen festen Zeitraum gehalten wird.

Eine Elektromigrationsinjektion erreicht man, indem man ein in geeigneter Weise polarisiertes elektrisches Potential für eine vorgegebene Dauer entlang des Kapillarröhrchens anlegt, während das Eintrittsende der Kapillare sich in dem Probenreservoir befindet. Dies kann zu einem Probenfehler führen, weil eine unverhältnismäßig größere Menge der Spezies mit höheren elektroforetischen Mobilitäten in das Röhrchen wandert. Die Kapillare wird aus dem Probenreservoir entfernt und nach der Injektionsdauer für beide Techniken wieder in dem Eintrittspufferreservoir plziert.

Anal. Chem. 1993, 65, 2637-2642 (Effenhauser et al.) offenbart "Glasspäne für Hochgeschwindigkeitskapillarelektroforesetrennungen mit Submikrometer-Bodenhöhen". Der offenbarte "Glasspan" enthält Kapillare, die in eine Glasplatte geätzt und mit einer Deckplatte abgedeckt sind. "Löcher in der Deckplatte gewähren Zugang zu den Kapillaren; Pipettenspitzen, die in diese Löcher eingeklebt sind, dienen als Reservoirs." Es wird ein Span mit sechs Reservoirs offenbart, die mit 1 bis 6 numeriert sind.

Kleine aliquote Teile von Proben werden zwischen Reservoirs, z.B. elektroosmotisch, bewegt. "Anlegen einer Spannung zwischen Reservoirs 1 (+2 kV) und 4 (Erdung) bewirkt, daß eine Probenlösung elektroosmotisch von 1 nach 4 gepumpt wird, wobei der 150 µm Abschnitt (Proben-schleife) der Trennkapillare (horizontaler Kanal in Figur 1) gefüllt wird. Nach einem Verzögerungszeitraum von 1 Sekunde wird die Trennungsspannung zwischen Reservoirs 2 (positiv) und 5 (Erdung) angelegt, was einen Fluß von Pufferlösung von 2 nach 5 und ein Befördern des Probenpfropfens in den Trennkanal induziert. Auf diese Art und Weise können geometrisch gut definierte Probenpfropfen von etwa 100 pl Volumen reproduzierbar injiziert werden. Eine zusätzliche Kapillare, die zum Reservoir 3 führt, erlaubt eine Injektion von zwei zusätzlichen Pfropfengrößen (Injektion von 1 nach 3, 300 µm; von 3 nach 4, 400 µm)."

Science, 1993, 261, 895 (Harrison et al.) titelt "Mikrotechnische Herstellung eines miniaturisierten auf Kapillarelektroforese basierenden chemischen Analysesystems auf einem Chip". Kapillarkanäle werden in ein Glassubstrat geätzt. "Strömungsrate und Strömungsrichtung des Lösungsmittels in einen Verteiler von sich kreuzenden Kanälen" wird gesteuert "durch gleichzeitiges Anlegen von Spannungen an jeden der Kapillarkanäle".

Ein weiteres Verfahren zur Steuerung des Volumens eines Probenpfropfens und dessen Injektion in eine Mikrochipelektroforesevorrichtung ("gedrängte" Beladung) ist in Anal. Chem. 1994, 66, 1107-1113 beschrieben.

Anal. Chem. 1994, 66, 2369-2373 (Jacobson et al.) offenbart "Elektrochromatographie mit offenem Kanal auf einem Mikrochip". Eine Anordnung von Kanälen, die Reservoirs miteinander verbinden, wird durch Photolithographie und Ätztechniken in einer Glasplatte ausgebildet. Elektroosmose wird dazu verwendet, Fluid zwischen den Reservoirs durch die Kanäle zu bewegen.

Es besteht ein anhaltender Bedarf nach Verfahren und Vorrichtungen, die zu verbesserter elektroforetischer Auflösung und verbesserter Injektionsstabilität führen.

Gesichtspunkte der Erfindung sind in den Patentansprüchen angegeben.

Ein Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zum Verteilen von Fluid-  
5   proben aus einem Fluidmaterial in einem Mikrochiplaborsystem bereit, wobei das System einen Auf-  
bau mit integrierten Kanälen in einer Flüssigkeitsverbindung mit wenigstens vier Reservoirs zur Auf-  
nahme des Fluidmaterials und ein System zum Anlegen eines elektrischen Potentials an die wenig-  
stens vier Reservoirs aufweist, wobei die Kanäle eine Kreuzung definieren aus: (a) einem ersten  
Kanal, über den ein erstes Vorratsreservoir in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung ist, einem  
10   zweiten Kanal, über den die Kreuzung in Flüssigkeitsverbindung mit einem ersten Abfallreservoir ist,  
(b) einem dritten Kanal, über den ein zweites Vorratsreservoir in Flüssigkeitsverbindung mit der  
Kreuzung ist, und (c) einem Trennkanal, über den die Kreuzung in Flüssigkeitsverbindung mit einem  
zweiten Abfallreservoir ist, wobei das Verfahren die Stufen umfaßt, in denen man:

- 15           A)    Potentiale an die ersten und zweiten Vorratsreservoirs und an die ersten und zweiten  
Abfallreservoirs in der Weise anlegt, daß Material von dem zweiten Vorratsreservoir  
zu den ersten und zweiten Abfallreservoirs und Material von dem ersten Vorratsre-  
servoir zu dem ersten Abfallreservoir strömt, so daß Material von dem ersten Vorrats-  
reservoir zu der Kreuzung geliefert wird,
- 20           B)    Potentiale an wenigstens das erste Vorratsreservoir und das zweite Abfallreservoir  
anlegt, so daß die Umleitung einer Probe aus Material, das aus dem ersten Vorrats-  
reservoir stammt, von der Kreuzung zu dem Trennkanal beginnt, und
- 25           C)    die Potentiale aus Stufe A) erneut anlegt, um die Umleitung zu beenden und die Pro-  
be durch den Trennkanal zu bewegen.

Ein Mikrochiplaborsystem gemäß dem einen Gesichtspunkt der Erfindung umfaßt einen Auf-  
bau mit integrierten Kanälen in einer Flüssigkeitsverbindung mit wenigstens vier Reservoirs zur Auf-  
30   nahme von Fluidmaterial und ein System zum Anlegen von elektrischen Potentials an die wenig-  
stens vier Reservoirs, wobei die Kanäle eine Kreuzung definieren aus: (a) einem ersten Kanal, über  
den ein erstes Vorratsreservoir in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung ist, einem zweiten Kanal,  
über den die Kreuzung in Flüssigkeitsverbindung mit einem ersten Abfallreservoir ist, (b) einem drit-  
ten Kanal, über den ein zweites Vorratsreservoir in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung ist, und  
35   (c) einem Trennkanal, über den die Kreuzung in einer Flüssigkeitsverbindung mit einem zweiten  
Abfallreservoir ist, wobei das System zum Anlegen elektrischer Potentiale so ausgelegt ist, daß es  
nach dem Verfahren gemäß dem genannten ersten Gesichtspunkt der Erfindung arbeitet.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die hierin beschrieben sind, stellen Mikro-  
chiplaborsysteme und Verfahren bereit, die es erlauben, komplexe biochemische und chemische

Verfahren auf einem Mikrochip unter elektronischer Steuerung durchzuführen. Das Mikrochiplaborsystem umfaßt eine Materialhandhabungseinrichtung, die Materialien durch ein System von miteinander verbundenen, integrierten Kanälen auf einem Mikrochip transportiert. Die Bewegung der Materialien wird durch Steuerung der elektrischen Felder, die in den integrierten Kanälen erzeugt werden, genau gelenkt. Die genaue Steuerung der Bewegung dieser Materialien ermöglicht präzises Mischen, Trennen und Umsetzen, wie es benötigt wird, um ein gewünschtes biochemisches oder chemisches Verfahren zu implementieren.

Ein besseres Verständnis der Erfindung erhält man anhand der nachfolgenden erläuternden Beschreibung in Verbindung mit den anhängenden Zeichnungen, welche bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung offenbaren.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

- |            |   |
|------------|---|
| Figur 1    | ist eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;   |
| Figur 2    | ist eine vergrößerte vertikale Querschnittsdarstellung eines gezeigten Kanals;  |
| Figur 3    | ist eine schematische Draufsicht auf einen Mikrochip gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;  |
| Figur 4    | ist eine vergrößerte Darstellung des Kreuzungsbereichs aus Figur 3;   |
| Figur 5    | zeigt CCD-Bilder eines Pfropfens aus Analyt, der sich durch die Kreuzung der Ausführungsform nach Figur 3 bewegt;   |
| Figur 6    | ist eine schematische Draufsicht auf ein Mikrochiplaborsystem (welches nicht der vorliegenden Erfindung entspricht);  |
| Figur 7    | ist ein CCD-Bild eines "Probenbeladungsmodus für Rhodamin B" (schattierter Bereich);  |
| Figur 8(a) | ist eine schematische Darstellung des Kreuzungsbereichs des Mikrochips aus Figur 6 vor der Analyteninjektion;   |
| Figur 8(b) | ist ein CCD-Fluoreszenzbild des gleichen Bereichs, wie er in Figur 8(a) gezeigt ist, nach dem Probenauftrag gemäß dem gedrängten Modus;                     |
| Figur 8(c) | ist eine Mikrofotografie von dem gleichen Bereich, wie er in Figur 8(a) dargestellt ist, nach dem Probenauftrag im schwimmenden bzw. frei fließenden Modus; |
| Figur 9    | zeigt integrierte Fluoreszenzsignale für injizierte Volumina, aufgetragen gegenüber der Zeit, für gedrängte und schwimmende Injektionen;                    |
| Figur 10   | ist eine schematische Draufsicht eines weiteren Mikrochips (welcher nicht der vorliegenden Erfindung entspricht);   |
| Figur 11   | ist eine vergrößerte Darstellung des Kreuzungsbereichs aus Figur 10;  |
| Figur 12   | ist eine schematische Draufsicht auf ein Mikrochiplaborsystem, auf welches die vorliegende Erfindung angewendet werden kann;                                |

- Figur 13(a) ist eine schematische Darstellung einer CCD-Kameraansicht des Kreuzungsbereichs des Mikrochiplaborsystems nach Figur 12;
- Figur 13(b) ist ein CCD-Fluoreszenzbild von dem gleichen Bereich, wie er in Figur 13(a) dargestellt ist, nach dem Probenaufruf im gedrängten Modus;
- 5 Figuren 13(c)-13(e) sind CCD-Fluoreszenzbilder von dem gleichen Bereich, wie er in Figur 13(a) dargestellt ist, welche aufeinanderfolgend einen Pfropfen eines Analyten zeigen, der sich von der Kanalkreuzung weg bewegt, bei 1, 2 bzw. 3 Sekunden nach Umschalten in den Durchlauf- bzw. Betriebsmodus;
- Figur 14 zeigt zwei Injektionsprofile von Didansyl-Lysin, welches für 2 Sekunden mit  $\gamma$  gleich 0,97 und 9,7 injiziert wurde;
- 10 Figur 15 sind Elektroferogramme bei (a) 3,3 cm, (b) 9,9 cm und (c) 16,5 cm vom Injektionspunkt für Rhodamin B (weniger zurückgehalten) und Sulforhodamin (stärker zurückgehalten);
- Figur 16 ist ein Diagramm der Effizienzdaten, die aus den Elektroferogrammen gemäß Figur 15 generiert wurden und welche die Veränderung der Bodenanzahl mit der Kanallänge zeigen für Rhodamin B (Quadrat mit Pluszeichen) und Sulforhodamin (Quadrat mit Punkt) mit der besten linearen Ausgleichskurve (durchgezogene Linien) für jeden Analyten;
- 15 Figur 17(a) ist ein Elektroferogramm von Rhodamin B und Fluoreszein mit einer Trennfeldstärke von 1,5 kV/cm und einer Trennungslänge von 0,9 mm;
- 20 Figur 17(b) ist ein Elektroferogramm von Rhodamin B und Fluoreszein mit einer Trennfeldstärke von 1,5 kV/cm und einer Trennungslänge von 1,6 mm;
- Figur 17(c) ist ein Elektroferogramm von Rhodamin B und Fluoreszein mit einer Trennfeldstärke von 1,5 kV/cm und einer Trennungslänge von 11,1 mm;
- 25 Figur 18 ist ein Diagramm, welches die Veränderung der Bodenanzahl pro Zeiteinheit als eine Funktion der elektrischen Feldstärke für Rhodamin B bei Trennungslängen von 1,6 mm (Kreis) und 11,1 mm (Quadrat) und für Fluoreszein bei Trennungslängen von 1,6 mm (Raute) und 11,1 mm (Dreieck) zeigt;
- Figur 19 zeigt ein Chromatogramm von Cumarinen, die durch Elektrochromatographie unter Verwendung des Systems nach Figur 12 analysiert wurden;
- 30 Figur 20 zeigt ein Chromatogramm von Cumarinen, das durch mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie unter Verwendung des Systems nach Figur 12 erhalten wurde;
- Figuren 21(a) und 21(b) zeigen die Trennung von drei Metallionen unter Verwendung des Systems nach Figur 12;
- 35 Figur 22 ist eine schematische Draufsicht auf einen Mikrochip gemäß einer Ausführungsform der Erfindung;
- Figur 23 ist eine schematische Darstellung der Ausführungsform nach Figur 22, welche angelegte Spannungen zeigt;



- Figur 24 zeigt zwei Elektroferogramme, die unter Verwendung der Ausführungsform nach Figur 22 produziert wurden;
- Figur 25 ist eine schematische Darstellung eines Mikrochiplaborsystems gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;
- 5 Figur 26 zeigt die Reproduzierbarkeit der injizierten Menge für Arginin und Glycin unter Verwendung des Systems nach Figur 25;
- Figur 27 zeigt die Überlagerung von drei elektroforetischen Trennungen unter Verwendung des Systems nach Figur 25;
- Figur 28 zeigt einen Auftrag von injizierten Mengen gegenüber der Reaktionszeit unter  
10 Verwendung des Systems nach Figur 25;
- Figur 29 zeigt ein Elektroferogramm von Restriktionsfragmenten, die unter Verwendung des Systems gemäß Figur 25 produziert wurden;
- Figur 30 ist eine schematische Darstellung eines Mikrochiplaborsystems gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;
- 15 Figur 31 ist eine schematische Darstellung der Vorrichtung nach Figur 21 und zeigt das aufeinanderfolgende Anlegen von Spannungen, um erwünschte Fluidmanipulationen zu bewirken; und
- Figur 32 ist ein Diagramm, welches die verschiedenen Spannungen zeigt, die angelegt wurden, um die Fluidmanipulationen gemäß Figur 23 zu bewirken.

20

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Integrierte Mikrolaborsysteme für die Analyse oder Synthese von Chemikalien erfordern eine genaue Art und Weise der Manipulation von Fluiden und fluidgestütztem Material und Aussetzen der  
25 Fluide an ausgewählte chemische oder physikalische Mileus, die gewünschte Umwandlungen oder Aufteilungen erzeugen. Unter den vorgegebenen Konzentrationen von Analyten, die chemische Umwandlungen in angemessenen Zeitmaßstäben erzeugen, der Natur der molekularen Erfassung, Diffusionszeiten und Herstellungsverfahren zur Schaffung von Einrichtungen in einem mikroskopischen Maßstab, verleihen sich miniaturisierte integrierte Mikrolaborsysteme selbst Kanäle mit Dimensionen in der Größenordnung von 1 bis 100 Mikrometern Durchmesser. In diesem Zusammen-  
30 hang wurde gezeigt, daß elektrokinetisches Pumpen zum Transportieren von Materialien in mikroskopisch hergestellten Laborsystemen vielseitig und wirkungsvoll ist.

Hierin offenbarte Systeme stellen die Werkzeuge bereit, die notwendig sind, elektrokinetisches Pumpen nicht nur bei Trennungen einzusetzen, sondern auch Flüssigkeitshandhabung durchzuführen, die andere wichtige Probenverarbeitungsstufen erfüllt, wie chemische Umwandlungen  
35 oder Probenaufteilung. Durch gleichzeitiges Steuern der Spannung an mehreren Anschlüssen, die durch Kanäle in einer Mikrochipstruktur verbunden sind, ist es möglich, Fluide mit großer Genauigkeit zu messen und zu verteilen, Reagenzien zu mischen, Reaktionsbestandteile zu inkubieren, die Bestandteile in Richtung von Stellen der physikalischen oder biochemischen Aufteilung zu lenken und die Bestandteile Detektorsystemen zuzuführen. Durch Kombinieren dieser Fähigkeiten auf ei-

nem einzelnen Mikrochip ist man in der Lage, vollständige, miniaturisierte, integrierte, automatisierte Laborsysteme für die Analyse oder Synthese von Chemikalien zu schaffen.

Solche integrierten Mikrolaborsysteme können aus mehreren Teilelementen aufgebaut sein. Teilelemente können Flüssigkeitsverteilungssysteme, Flüssigkeitsmischsysteme, molekulare Aufteilungssysteme, Detektorfenster usw. umfassen. Zum Beispiel kann man, wie es hierin beschrieben ist, ein relativ vollständiges System für die Identifizierung von Restriktionsendonukleasestellen in einem DNA-Molekül aufbauen. Diese einzelne mikrotechnisch hergestellte Vorrichtung umfaßt somit in einem einzelnen System die Funktionen, die traditionell von einem Techniker durchgeführt werden, der Pipetten, Inkubatoren, Gelelektroforesesysteme und Datenerfassungssysteme verwendet. In diesem System wird DNA mit einem Enzym gemischt, das Gemisch wird inkubiert, und ein ausgewähltes Volumen des Reaktionsgemischs wird in einen Trennkanal gegeben. Elektroforese wird gleichzeitig mit einer Fluoreszenzmarkierung der DNA durchgeführt.

In Figur 1 ist ein Beispiel eines Mikrochiplaborsystems 10 gezeigt, das für eine Implementierung einer ganzen chemischen Analyse oder Synthese konfiguriert ist. Das Laborsystem 10 umfaßt sechs Reservoirs, 12, 14, 16, 18, 20 und 22, die miteinander durch ein System von Kanälen 24 verbunden sind, die durch mikrotechnische Materialbearbeitung in ein Substrat oder Basisteil (in Figur 1 nicht dargestellt) eingebracht sind, wie es nachfolgend ausführlicher diskutiert wird. Jedes Reservoir 12-22 steht in Flüssigkeitsverbindung mit einem entsprechenden Kanal 26, 28, 30, 32, 34, 36 und 38 des Kanalsystems 24. Der erste Kanal 26, der von dem ersten Reservoir 12 weg führt, ist mit dem zweiten Kanal 28, der von dem zweiten Reservoir 14 weg führt, an einer ersten Kreuzung 38 verbunden. In gleicher Weise ist der dritte Kanal 30 von dem dritten Reservoir 16 mit dem vierten Kanal 32 an einer zweiten Kreuzung 40 verbunden. Die erste Kreuzung 38 ist mit der zweiten Kreuzung 40 durch eine Reaktionskammer oder einen Kanal 42 verbunden. Der fünfte Kanal 34 von dem fünften Reservoir 20 ist ebenfalls mit der zweiten Kreuzung 40 verbunden, so daß die zweite Kreuzung 40 eine Vierwegekreuzung der Kanäle 30, 32, 34 und 42 ist. Der fünfte Kanal 34 kreuzt auch den sechsten Kanal 36 von dem sechsten Reservoir 22 an einer dritten Kreuzung 44.

Die in den Reservoirs gespeicherten Materialien werden vorzugsweise elektrokinetisch durch das Kanalsystem 24 transportiert, um die gewünschte Analyse oder Synthese zu implementieren. Zur Bereitstellung solch eines elektrokinetischen Transports umfaßt das Laborsystem 10 einen Spannungsregler 46, der in der Lage ist, auswählbare Spannungsniveaus, einschließlich Erdung, anzulegen. Solch ein Spannungsregler kann unter Verwendung mehrerer Spannungsteiler und mehrerer Relais implementiert sein, um die auswählbaren Spannungsniveaus zu erhalten. Der Spannungsregler ist mit einer Elektrode verbunden, die in jedem der sechs Reservoirs 12-22 durch Spannungsleitungen V1-V6 angeordnet ist, um die gewünschten Spannungen an die Materialien in den Reservoirs anzulegen. Vorzugsweise umfaßt der Spannungsregler auch Sensorkanäle S1, S2 und S3, die mit den ersten, zweiten und dritten Kreuzungen 38, 40 bzw. 44 verbunden sind, um die an diesen Kreuzungen anliegenden Spannungen zu erfassen.

Die Anwendung von elektrokinetischem Transport auf mikrominiaturisierte, planare Flüssigphasentrennungseinrichtungen, wie sie oben beschrieben sind, ist ein entwicklungsfähiger Ansatz

für die Probenmanipulation und als ein Pumpmechanismus für Flüssigchromatographie. Ein System, wie es hierin offenbart ist, bringt die Verwendung von elektroosmotischem Fluß zum Mischen verschiedener Fluide in einer kontrollierten und reproduzierbaren Art und Weise mit sich. Wenn ein geeignetes Fluid in einem Röhrchen plaziert wird, das aus einem entsprechend geeigneten Material hergestellt ist, können funktionale Gruppen an der Oberfläche des Röhrchens ionisieren. Im Fall von Rohrmaterialien, die mit Hydroxylgruppen enden, werden Protonen die Oberfläche verlassen und in ein wäßriges Lösungsmittel eintreten. Unter solchen Bedingungen wird die Oberfläche eine negative Nettoladung haben, und das Lösungsmittel wird einen Überschuß an positiven Ladungen aufweisen, in den meisten Fällen in der geladenen Doppellage an der Oberfläche. Mit der Anwendung eines elektrischen Feldes entlang des Röhrchens werden die überschüssigen Kationen zur Kathode oder negativen Elektrode angezogen werden. Die Bewegung dieser positiven Ladungen durch das Röhrchen wird das Lösungsmittel mitziehen. Die Geschwindigkeit im stabilen Zustand ist durch Gleichung I gegeben,

$$v = \frac{\epsilon \xi E}{4\pi\eta} \quad (I)$$

worin  $v$  die Lösungsmittelgeschwindigkeit,  $\epsilon$  die Dielektrizitätskonstante des Fluides,  $\xi$  das Zetapotential der Oberfläche,  $E$  die elektrische Feldstärke und  $\eta$  die Lösungsmittelviskosität ist. Aus Gleichung I ist es offensichtlich, daß die Fluidflußgeschwindigkeit oder Flußrate durch die elektrische Feldstärke gesteuert werden kann. Somit kann Elektroosmose als ein programmierbarer Pumpmechanismus verwendet werden.

Das in Figur 1 gezeigte Labormikrochipssystem 10 könnte zur Durchführung vieler Arten von Laboranalysen oder -synthesen verwendet werden, wie DNA-Sequenzierung oder -Analyse, Elektrochromatographie, mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC), anorganische Ionenanalyse und Gradientenelutionsflüssigchromatographie, wie es nachfolgend ausführlicher diskutiert wird. Der fünfte Kanal 34 wird typischerweise für elektroforetische oder elektrochromatographische Trennungen verwendet und kann somit in bestimmten Ausführungsformen als ein Trennkanal oder eine Trennsäule bezeichnet sein. Die Reaktionskammer 42 kann dazu verwendet werden, irgendwelche zwei Chemikalien, die in den ersten und zweiten Reservoirs 12, 14 gespeichert sind, zu mischen. Zum Beispiel könnte DNA aus dem ersten Reservoir 12 mit einem Enzym aus dem zweiten Reservoir 14 in der ersten Kreuzung 38 gemischt werden, und das Gemisch könnte in der Reaktionskammer 42 inkubiert werden. Das inkubierte Gemisch könnte dann durch die zweite Kreuzung 40 in die Trennsäule 34 zur Trennung transportiert werden. Das sechste Reservoir 22 kann dazu verwendet werden, eine Fluoreszenzmarkierung zu speichern, die in der dritten Kreuzung 44 mit den Materialien, die in der Trennsäule 34 getrennt wurden, gemischt wird. Ein geeigneter Detektor (D) könnte dann dazu verwendet werden, die markierten Materialien zwischen der dritten Kreuzung 44 und dem fünften Reservoir 20 zu analysieren. Durch Bereitstellung einer Vor-

Trennsäulenreaktion in der ersten Kreuzung 38 und der Reaktionskammer 42 und einer Nach-Trennsäulenreaktion in der dritten Kreuzung 44 kann das Laborsystem 10 zur Implementierung vieler Standardlabortechniken verwendet werden, die normalerweise in einem herkömmlichen Labor manuell implementiert sind. Darüber hinaus könnten die Elemente des Laborsystems 10 dazu verwendet werden, ein komplexeres System aufzubauen, um komplexere Laborverfahren zu lösen.

Das Labormikrochipsystem 10 umfaßt ein Substrat oder Basisteil (in Figur 1 nicht gezeigt), welches ein etwa 2 Inch (50 mm) x 1 Inch (25 mm) großes Teil eines Objektträgers (Coming, Inc. #2947) sein kann. Obwohl Glas ein bevorzugtes Material ist, können andere ähnliche Materialien verwendet werden, wie Siliciumdioxidglas, kristalliner Quarz, Quarzglas, Kunststoffe und Silicium (wenn die Oberfläche ausreichend behandelt wird, um dessen Widerstand zu verändern). Vorzugsweise wird ein nicht leitfähiges Material, wie Glas oder Quarzglas, verwendet, um zu ermöglichen, daß relativ hohe elektrische Felder für das elektrokinetische Transportieren von Materialien durch Kanäle in dem Mikrochip angelegt werden können. Halbleitermaterialien, wie Silicium, könnten ebenfalls verwendet werden, aber das angelegte elektrische Feld würde normalerweise auf einem Minimum gehalten werden müssen (etwa weniger als 300 V/cm unter Anwendung derzeitiger Techniken zur Bereitstellung von isolierenden Schichten), was eine ungenügende elektrokinetische Bewegung liefern könnte.

Das Kanalmuster 24 wird in einer planaren Oberfläche des Substrats unter Verwendung von photolithographischen Standardverfahren, gefolgt von naßchemischem Ätzen, ausgebildet. Das Kanalmuster kann mit einem positiven Photoresist (Shipley 1811) und einer mit einem Elektronenstrahl geschriebenen Chrommaske (Institute of Advanced Manufacturing Sciences, Inc.) auf das Substrat übertragen werden. Das Muster kann unter Verwendung einer HF/NH<sub>4</sub>F-Lösung chemisch geätzt werden.

Nach Ausbildung des Kanalmusters kann eine Deckplatte anschließend unter Verwendung einer direkten Verbindungstechnik mit dem Substrat verbunden werden, wobei die Substrat- und die Deckplattenoberflächen zuerst in einer verdünnten NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hydrolysiert und anschließend miteinander verbunden werden. Der Aufbau wird dann bei etwa 500°C getempert, um eine gute Haftung der Deckplatte an dem Substrat sicherzustellen.

Nach dem Verbinden der Deckplatte werden die Reservoirs an dem Substrat befestigt, wobei Abschnitte der Deckplatte dazwischen unter Verwendung von Epoxidharz oder anderen geeigneten Mitteln schichtartig angeordnet sind. Die Reservoirs können zylindrisch mit offenen gegenüberliegenden axialen Enden ausgebildet sein. Typischerweise wird ein elektrischer Kontakt hergestellt, indem man eine Platindrahtelektrode in jedem Reservoir anordnet. Die Elektroden werden mit einem Spannungsregler 46 verbunden, der ein gewünschtes Potential an ausgewählte Elektroden in einer nachfolgend ausführlicher beschriebenen Art und Weise anlegt.

Ein Querschnitt des ersten Kanals ist in Figur 2 gezeigt und mit dem Querschnitt jedes der anderen integrierten Kanäle identisch. Wenn man ein nichtkristallines Material (wie Glas) für das Substrat verwendet und wenn die Kanäle naßchemisch geätzt werden, findet ein isotropes Ätzen statt, d.h. das Glas wird gleichmäßig in allen Richtungen geätzt, und die resultierende Kanalgeome-

trie ist trapezförmig. Der trapezförmige Querschnitt beruht auf einem "Unterschneiden" durch das chemische Ätzverfahren an der Kante des Photoresists. Bei einer Ausführungsform hat der Kanalquerschnitt der erläuterten Ausführungsform Abmessungen von 5,2  $\mu\text{m}$  in der Tiefe, 57  $\mu\text{m}$  in der Breite an der Oberseite und 45  $\mu\text{m}$  in der Breite an der Unterseite. Bei einer anderen Ausführungsform hat der Kanal eine Tiefe "d" von 10  $\mu\text{m}$ , eine obere Breite "w1" von 90  $\mu\text{m}$  und eine untere Breite "w2" von 70  $\mu\text{m}$ .

Ein wichtiger Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung ist der kontrollierte elektrokinetische Transport von Materialien durch das Kanalsystem 24. Dieser kontrollierte elektrokinetische Transport kann dazu verwendet werden, eine ausgewählte Menge an Material aus einem der Reservoirs durch eine oder mehrere Kreuzungen der Kanalstruktur 24 zu verteilen. Alternativ, wie es oben erwähnt ist, können ausgewählte Mengen an Materialien aus zwei Reservoirs zu einer Kreuzung transportiert werden, wo die Materialien in gewünschten Konzentrationen gemischt werden können.

#### Gesteuerter Verteiler gemäß der Erfindung

In Figur 3 ist eine Laborkomponente 10A gezeigt, die dazu verwendet werden kann, ein Verfahren zum Transportieren von Materialien durch eine Kanalstruktur 24A zu implementieren. Das A, das jeder Zahl in Figur 3 nachgestellt ist, bedeutet, daß sie einem entsprechenden Element aus Figur 1 mit der gleichen Zahl ohne das A entspricht. Zur Vereinfachung sind die Elektroden und die Verbindungen zu dem Spannungsregler, der den Transport von Materialien durch das Kanalsystem 24A steuert, in Figur 3 nicht gezeigt.

Das in Figur 3 gezeigte Mikrochiplaborsystem 10A steuert die Menge an Material aus dem ersten Reservoir 12A, das durch die Kreuzung 40A in Richtung des vierten Reservoirs 20A transportiert wird, durch elektrokinetisches Öffnen und Schließen des Zugangs zu der Kreuzung 40A von dem ersten Kanal 26A. Als solches implementiert das Labormikrochipsystem 10A im wesentlichen ein gesteuertes elektrokinetisches Ventil. Solch ein elektrokinetisches Ventil kann als ein Verteiler verwendet werden, um ausgewählte Volumina eines einzelnen Materials abzugeben, oder als ein Mischer, um ausgewählte Volumina mehrerer Materialien in der Kreuzung 40A zu mischen. Allgemein wird Elektroosmose dazu verwendet, "Fluidmaterialien" zu transportieren, und Elektroforese wird dazu verwendet, Ionen zu transportieren, ohne das Fluidmaterial, das die Ionen umgibt, zu transportieren. Dementsprechend wird der Begriff "Material", wie er hierin benutzt wird, in breiter Weise verwendet, um jede Form von Material abzudecken, einschließlich Fluiden und Ionen.

Das Laborsystem 10A liefert einen kontinuierlichen, unidirektionalen Fluß von Fluid durch den Trennkanal 34A. Dieses Injektions- oder Verteilungsschema erfordert nur, daß die Spannung von einem (oder zwei) Reservoir(s) verändert oder entfernt wird, und erlaubt, daß das vierte Reservoir 20A beim Erdungspotential verbleibt. Dies ermöglicht, daß Injektion und Trennung mit einer Stromquelle mit nur einer Spannungsrichtung durchgeführt werden.

Eine vergrößerte Darstellung der Kreuzung 40A ist in Figur 4 gezeigt. Die Richtungspfeile deuten die zeitliche Abfolge der Strömungsprofile an der Kreuzung 40A an. Die durchgezogenen Pfeile zeigen das anfängliche Strömungsmuster. Spannungen an den verschiedenen Reservoirs

sind so eingestellt, so daß das beschriebene Strömungsmuster erhalten wird. Das anfängliche Strömungsmuster bringt ein zweites Material aus dem zweiten Reservoir 16A mit einer ausreichenden Rate, daß das gesamte erste Material, das aus dem Reservoir 12A zu der Kreuzung 40A transportiert wird, in Richtung des dritten Reservoirs 18A geschoben wird. Allgemein wird die Potentialverteilung so sein, daß das höchste Potential an dem zweiten Reservoir 16A, ein etwas niedrigeres Potential an dem ersten Reservoir 12A und ein noch niedrigeres Potential an dem dritten Reservoir 18A anliegt, wobei das vierte Reservoir 20A geerdet ist. Unter diesen Bedingungen besteht der Strom in Richtung des vierten Reservoirs 20A alleine aus dem zweiten Material aus dem zweiten Reservoir 16A.

Um Material aus dem ersten Reservoir 12A durch die Kreuzung 40A abzugeben, kann das Potential an dem zweiten Reservoir 16A auf einen Wert umgeschaltet werden, der geringer ist als das Potential des ersten Reservoirs 12A, oder die Potentiale an den Reservoirs 16A und/oder 18A können kurzzeitig erhöht werden, um den in Figur 4 durch die kurzgestrichelten Pfeile gezeigten Fluß zu liefern. Unter diesen Bedingungen wird der primäre Fluß aus dem ersten Reservoir 12A nach unten in Richtung des Trennkanalabfallreservoirs 20A stattfinden. Der Fluß von den zweiten und dritten Reservoirs 16A, 18A wird gering sein und könnte in jeder Richtung stattfinden. Diese Bedingung wird lange genug beibehalten, um eine gewünschte Menge an Material aus dem ersten Reservoir 12A durch die Kreuzung 40A und in den Trennkanal 30A zu transportieren. Nach ausreichender Zeit für den Durchtritt des gewünschten Materials durch die Kreuzung 40A wird die Spannungsverteilung auf die ursprünglichen Werte zurückgeschaltet, um zu verhindern, daß zusätzliches Material aus dem ersten Reservoir 12A durch die Kreuzung 40A in Richtung des Trennkanals 34A fließt.

Eine Anwendung für solch einen "gesteuerten Verteiler" besteht darin, einen kontrollierten, in der Größe variablen Pfropfen eines Analyten aus dem ersten Reservoir 12A für eine elektroforetische oder chromatographische Trennung in den Trennkanal 34A zu injizieren. In solch einem System speichert das erste Reservoir 12A Analyt, das zweite Reservoir 16A speichert einen ionischen Puffer, das dritte Reservoir 18A ist ein erstes Abfallreservoir, und das vierte Reservoir 20A ist ein zweites Abfallreservoir. Um einen kleinen variablen Pfropfen eines Analyten aus dem ersten Reservoir 12A zu injizieren, werden die Potentiale an dem Pufferreservoir und dem ersten Abfallreservoir 16A, 18A einfach für eine kurze Zeitdauer ( $\approx 100$  ms) erdfrei geschaltet, um zu ermöglichen, daß der Analyt in der Trennsäule 34A nach unten wandert. Um den Injektionspfropfen abubrechen, werden die Potentiale an dem Pufferreservoir 16A und dem ersten Abfallreservoir 18A wieder angelegt. Alternativ könnte die Schließsequenz bewirkt werden, indem man die Reservoirs 16A und 18A auf das Potential der Kreuzung 40A bringt und sie anschließend auf ihre ursprünglichen Potentiale zurücksetzt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die Zusammensetzung des injizierten Pfropfens eine elektroforetische Mobilitätsneigung besitzt, wobei die schneller wandernden Verbindungen gegenüber den langsamer wandernden Verbindungen bevorzugt in die Trennsäule 34A eingebracht werden.

In Figur 5 kann man eine aufeinanderfolgende Darstellung von CCD-Bildern eines Pfropfens aus Analyt sehen, der sich durch die Kreuzung aus Figur 3 bewegt. Der Analyt, der durch das Laborsystem 10A gepumpt wurde, war Rhodamin B (dunkler Bereich), und die Orientierung der CCD-Bilder des Injektionskreuzes oder der Kreuzung ist die gleiche wie in Figur 3. Das erste Bild (A) zeigt den Analyten, der durch das Injektionskreuz oder die Kreuzung in Richtung des ersten Abfallreservoirs 18A gepumpt wird, vor der Injektion. Das zweite Bild (B) zeigt den Analytenpfropfen, der in die Trennsäule 34A injiziert wird. Das dritte Bild (C) zeigt den Analytenpfropfen, der sich von der Injektionskreuzung weg bewegt, nachdem ein Injektionspfropfen vollständig in die Trennsäule 34A eingebracht wurde. Die Potentiale an dem Puffer- und dem ersten Abfallreservoir 16A, 18A wurden für 100 ms erdfrei geschaltet, während sich die Probe in die Trennsäule 34A bewegte. Zu dem Zeitpunkt des Bildes (C) hat der geschlossene Beschränkungsmodus damit begonnen, weiteren Analyten daran zu hindern, sich durch die Kreuzung 40A in die Trennsäule 34A zu bewegen, und ein sauberer Injektionspfropfen mit einer Länge von 142  $\mu\text{m}$  wurde in die Trennsäule eingebracht. Wie es unten diskutiert wird, trägt der gesteuerte Injektor nur zu einem geringen Teil zu der gesamten Bodenhöhe bei. Die Injektionspfropfenlänge (Volumen) ist eine Funktion der Zeit der Injektion und der elektrischen Feldstärke in der Säule. Die Form des injizierten Pfropfens ist aufgrund der Ausrichtung des Spaltungspufferflusses leicht verzerrt. Für eine vorgegebene Injektionsdauer ist die Reproduzierbarkeit der injizierten Menge, die durch Integration der Peakfläche bestimmt wird, jedoch 1% RSD für eine Reihe von zehn wiederholten Injektionen.

Elektroforeseexperimente wurden unter Verwendung des Mikrochiplaborsystems 10A aus Figur 3 durchgeführt, und es wurde die Methodik gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet. Die Chipdynamik wurde unter Verwendung von Analytenfluoreszenz analysiert. Eine Kamera mit ladungsgekoppeltem Bauelement (CCD) wurde dazu verwendet, bestimmte Bereiche des Chips aufzuzeichnen, und ein Photomultiplerröhrchen (PMT) verfolgte Einzelpunktereignisse. Die CCD-Kamera (Princeton Instruments, Inc., TE/CCD-512TKM) wurde auf ein Stereomikroskop (Nikon SMZ-U) montiert, und das Laborsystem 10A wurde unter Verwendung eines Argonionenlasers (514,5 nm, Coherent Innova 90), der bei 3 W betrieben wurde und bei dem der Strahl auf einen kreisförmigen Punkt mit 2 cm Durchmesser aufgeweitet war, beleuchtet. Das PMT mit Sammeloptik war unterhalb des Mikrochips mit der optischen Achse senkrecht zu der Mikrochipoberfläche angeordnet. Der Laser wurde bei etwa 20 mW betrieben, und der Strahl traf auf den Mikrochip in einem Winkel von 45° von der Mikrochipoberfläche und parallel zu dem Trennkanal auf. Der Laserstrahl und die PMT-Beobachtungsachse waren durch einen Winkel von 135° voneinander getrennt. Bei dem Punkterfassungssystem wurde ein Helium-Neon-Laser (543 nm, PMS Electro-optics LHGP-0051) mit einem Elektrometer (Keithley 617) verwendet, um die Antwort des PMT (Oriel 77340) aufzuzeichnen. Der Spannungsregler 46 (Spellman CZE 1000R) für die Elektroforese wurde zwischen 0 und +4,4 kV, relativ zur Erdung, betrieben.

Der Typ von gesteuertem Injektor, der in Bezug auf die Figuren 3 und 4 beschrieben ist, zeigt eine auf elektroforetischer Mobilität basierende Vorspannung bzw. einen Fehler, wie es bei herkömmlichen elektroosmotischen Injektionen der Fall ist. Dennoch besitzt dieser Ansatz Einfach-

heit bezüglich der Anforderungen an die Spannungsumschaltung und an die Herstellung und liefert einen kontinuierlichen unidirektionalen Fluß durch den Trennkanal. Darüber hinaus liefert der gesteuerte Injektor ein Verfahren zum Ablassen eines variablen Volumens von Fluid in den Trennkanal 34A in einer Art und Weise, die durch die angelegten elektrischen Potentiale präzise gesteuert wird.

5 Eine weitere Anwendung des gesteuerten Verteilers 10A besteht darin, gewünschte Mengen an Materialien in einer kontrollierten Art und Weise zu verdünnen oder zu mischen. Zur Implementierung solch eines Mischungssystems, um die Materialien aus den ersten und zweiten Reservoirs 12A, 16A zu mischen, müssen die Potentiale in den ersten und zweiten Kanälen 26A, 30A höher gehalten werden als das Potential der Kreuzung 40A während des Mischens. Diese Potentiale werden bewirken, daß sich die Materialien aus den ersten und zweiten Reservoirs 12A und 16A gleichzeitig durch die Kreuzung 40A bewegen und dabei die zwei Materialien gemischt werden. Die an den ersten und zweiten Reservoirs 12A, 16A angelegten Potentiale können so eingestellt werden, wie es erwünscht ist, um für jedes Material die ausgewählte Konzentration zu erzielen. Nach der Abgabe der gewünschten Mengen jedes Materials kann das Potential an dem zweiten Reservoir 15 16A in einer Art und Weise erhöht werden, die ausreicht, zu verhindern, daß weiteres Material aus dem ersten Reservoir 12A durch die Kreuzung 40A in Richtung des dritten Reservoirs 30A transportiert wird.

#### Analytinejektor

20 In Figur 6 ist ein Mikrochipanalytinejektor 10B gezeigt, welcher nicht der vorliegenden Erfindung entspricht. Das Kanalmuster 24B besitzt vier begrenzte Kanäle 26B, 30B, 32B und 34B, die durch mikrotechnische Bearbeitung in ein Substrat 49 eingebracht wurden, wie es oben diskutiert wurde. Jeder Kanal hat ein zugehöriges Reservoir, das über dem Ende jedes Kanalabschnitts angebracht ist, und alle vier Kanäle kreuzen sich an einem Ende in einer Vierwegekreuzung 40B. Die gegenüberliegenden Enden jedes Abschnitts liefern Enden, die sich gerade hinter die Umfangskante einer Deckplatte 49', die auf dem Substrat 49 befestigt ist, erstrecken. Der in Figur 6 gezeigte Analytinejektor 10B ist zu dem gesteuerten Verteiler 10A im wesentlichen identisch mit der Ausnahme, daß die elektrischen Potentiale in einer Art und Weise angelegt werden, daß ein Volumen von Material aus Reservoir 16B durch die Kreuzung 40B und nicht aus dem Reservoir 12B injiziert wird, und das 30 Volumen an injiziertem Material wird durch die Größe der Kreuzung gesteuert.

Der in Figur 6 gezeigte Injektor kann für verschiedene Materialmanipulationen verwendet werden. In einer Anwendung wird das Laborsystem dazu verwendet, einen Analyten aus einem Analytenreservoir 16B durch die Kreuzung 40B in den Trennkanal 34B zu injizieren. Der Analytinejektor 10B kann entweder in einem "Beladungsmodus" oder einem "Durchlaufmodus" betrieben werden. 35 Dem Reservoir 16B wird ein Analyt und dem Reservoir 12B Puffer zugeführt. Reservoir 18B stellt ein Analytenabfallreservoir dar, und Reservoir 20B stellt ein Abfallreservoir dar.

In dem "Beladungsmodus" sind wenigstens zwei Arten der Analyteneinbringung möglich. Bei der ersten, die als eine "erdfrei geschaltete" Beladung bekannt ist, wird ein Potential an das Analytenreservoir 16B angelegt, wobei das Reservoir 18B geerdet ist. Gleichzeitig sind die Reservoirs



12B und 20B erdfrei, was bedeutet, daß sie weder mit der Stromquelle verbunden, noch geerdet sind.

Der zweite Beladungsmodus ist der "gedrängte" Beladungsmodus, bei dem Potentiale gleichzeitig an Reservoirs 12B, 16B und 20B angelegt werden, wobei Reservoir 18B geerdet ist, um die Injektionspfropfenform zu steuern, wie es nachfolgend ausführlicher diskutiert wird. Wie es hierin verwendet wird, bedeutet gleichzeitiges Steuern von elektrischen Potentialen an mehreren Reservoirs, daß die Elektroden während der gleichen chemisch signifikanten Zeitdauer mit einer Betriebsstromquelle verbunden sind. Erdfreischnalten eines Reservoirs bedeutet, die Verbindung der Elektrode in dem Reservoir von der Stromquelle zu trennen, und somit wird das elektrische Potential an dem Reservoir nicht gesteuert.

In dem "Durchlaufmodus" wird ein Potential an das Pufferreservoir 12B angelegt, wobei das Reservoir 20B geerdet ist und wobei die Reservoirs 16B und 18B ungefähr die Hälfte des Potentials von dem Reservoir 12B aufweisen. Während des Durchlaufmodus bewirkt das relativ hohe Potential, das an das Pufferreservoir 12B angelegt ist, daß sich der Analyt in der Kreuzung 40B in Richtung des Abfallreservoirs 20B in der Trennsäule 34B bewegt.

Diagnostische Experimente wurden unter Verwendung von Rhodamin B und Sulforhodamin 101 (Exciton Chemical Co., Inc.) als Analyt mit 60  $\mu\text{M}$  für die CCD-Bilder und 6  $\mu\text{M}$  für die Punkterfassung durchgeführt. Ein Natriumtetraboratpuffer (50 mM, pH 9,2) war die mobile Phase in den Experimenten. Eine Injektion von räumlich gut definierten kleinen Volumina ( $\approx 100$  pl) und mit kleiner Längsausdehnung ( $\approx 100$   $\mu\text{m}$ ) ist vorteilhaft, wenn diese Arten von Analysen durchgeführt werden.

Der Analyt wird in das Injektionskreuz als ein vorderes Elektroferogramm eingebracht, und sobald die Front des langsamsten Analytenbestandteils durch das Injektionskreuz oder die Kreuzung 40B hindurchtritt, ist der Analyt bereit, analysiert zu werden. In Figur 7 zeigt ein CCD-Bild (dessen Bereich durch das Quadrat mit unterbrochener Linie angegeben ist) das Strömungsmuster des Analyten 54 (dunkler Bereich) und des Puffers (weißer Bereich) durch den Bereich der Injektionskreuzung 40B.

Durch Drängen des Analytenflusses ist das Volumen des Analytenpfropfens über die Zeit stabil. Die geringfügige Asymmetrie der Pfpfenform beruht auf den unterschiedlichen elektrischen Feldstärken in dem Pufferkanal 26B (470 V/cm) und dem Trennkanal 34B (100 V/cm), wenn an dem Puffer, den Analyten und die Abfallreservoirs 1,0 kV angelegt werden und das Analytenabfallreservoir geerdet ist. Jedoch beeinflussen die verschiedenen Feldstärken nicht die Stabilität des injizierten Analytenpfropfens. Wenn der Analytenpfropfen in den Trennkanal 34B injiziert wird, würde idealerweise nur der Analyt in dem Injektionskreuz oder der Kreuzung 40B in den Trennkanal wandern.

Das Volumen des Injektionspfropfens in dem Injektionskreuz beträgt etwa 120 pl bei einer Pfpfenlänge von 130  $\mu\text{m}$ . Ein Teil des Analyten 54 in dem Analytenkanal 30B und dem Analytenabfallkanal 32B wird in den Trennkanal 34B gezogen. Nach der Umschaltung in den Trenn- (Durchlauf-) Modus beträgt das Volumen des Injektionspfropfens etwa 250 pl bei einer Pfpfenlänge von

208  $\mu\text{m}$ . Diese Dimensionen sind aus einer Reihe von CCD-Bildern geschätzt, die unmittelbar nach dem Umschalten in den Trennmodus hergestellt wurden.

Die zwei Beladungsmodi wurden für die Analyteinbringung in den Trennkanal 34B getestet. Der Analyt wurde in dem Analytenreservoir 16B untergebracht und bei beiden Injektionssystemen in die Richtung des Reservoirs 18B, einem Abfallreservoir, "transportiert". CCD-Bilder der zwei Arten von Injektionen sind in den Figuren 8(a)-8(c) gezeigt. Figur 8(a) zeigt schematisch die Kreuzung 40B sowie die Endabschnitte von Kanälen.

Das CCD-Bild von Figur 8(b) zeigt eine Beladung in dem gedrängten Modus unmittelbar bevor in den Durchlaufmodus umgeschaltet wird. In dem gedrängten Modus wird Analyt (in weiß gegen dunklen Hintergrund gezeigt) elektroforetisch und elektroosmotisch aus Reservoir 16B zu Reservoir 18B (von links nach rechts) gepumpt, wobei Puffer aus dem Pufferreservoir 12B (oben) und dem Abfallreservoir 20B (unten) in Richtung des Reservoirs 18B (rechts) befördert wird. Die an die Reservoirs 12B, 16B, 18B und 20B angelegten Spannungen betrugen 90%, 90%, 0 bzw. 100% des Ausgangs der Stromquelle, was elektrischen Feldstärken in den entsprechenden Kanälen von 400, 270, 690 bzw. 20 V/cm entspricht. Obwohl die an das Abfallreservoir 20B angelegte Spannung höher ist als die Spannung, die an das Analytenreservoir 18B angelegt ist, liefert die zusätzliche Länge des Trennkanals 34B, verglichen mit dem Analytenkanal 30B, zusätzlichen elektrischen Widerstand, und daher überwiegt der Fluß aus dem Analytenpuffer 16B in die Kreuzung. Folglich hat der Analyt in dem Injektionskreuz oder der Kreuzung 40B eine Trapezform und ist in dem Kanal 32B durch dieses Materialtransportmuster räumlich begrenzt.

Figur 8(c) zeigt eine Beladung im erdfrei geschalteten Modus. Der Analyt wird aus dem Reservoir 16B zu 18B gepumpt, wie bei der gedrängten Injektion, mit der Ausnahme, daß an die Reservoirs 12B und 20B kein Potential angelegt wird. Indem der Fluß von mobiler Phase (Puffer) in den Kanalabschnitten 26B und 34B nicht gesteuert wird, kann sich der Analyt frei in diese Kanäle durch Konvektions- und Diffusionsströmung ausbreiten, was zu einem längeren Injektionspfropfen führt.

Wenn man die gedrängten und erdfreien Injektionen vergleicht, ist die gedrängte Injektion in drei Bereichen überragend: zeitliche Stabilität des injizierten Volumens, die Genauigkeit des injizierten Volumens und Pfropfenlänge. Wenn zwei oder mehr Analyten mit erheblich unterschiedlichen Mobilitäten zu analysieren sind, stellt eine Injektion mit zeitlicher Stabilität sicher, daß gleiche Volumina der sich schneller und langsamer bewegenden Analyten in die Trennsäule oder den -kanal 34B eingebracht werden. Die hohe Reproduzierbarkeit des Injektionsvolumens erleichtert die Möglichkeit, quantitative Analyse durchzuführen. Eine geringere Pfropfenlänge führt zu einer höheren Trenneffizienz und folglich zu einer größeren Komponentenaufnahmefähigkeit für ein vorgegebenes Instrument und zu Trennungen mit höherer Geschwindigkeit.

Um die zeitliche Stabilität für jeden Modus zu bestimmen, wurden Reihen von CCD-Fluoreszenzbildern in Intervallen von 1,5 Sekunden, beginnend unmittelbar bevor der Analyt die Injektionskreuzung 40B erreicht, gesammelt. Eine Abschätzung der Menge an Analyt, der injiziert

wurde, wurde durch Integrieren der Fluoreszenz in der Kreuzung 40B und den Kanälen 26B und 34B bestimmt. In Figur 9 ist die Fluoreszenz gegenüber der Zeit aufgetragen.

Für die gedrängte Injektion stabilisiert sich das injizierte Volumen in wenigen Sekunden und hat eine Stabilität von 1% relativer Standardabweichung (RSD), welche mit der Stabilität des bestrahlenden Lasers vergleichbar ist. Für die erdfreie Injektion steigt die Menge an Analyt, der in den Trennkanal 34B zu injizieren ist, aufgrund des dispersiven Flusses von Analyt in die Kanäle 26B und 34B mit der Zeit an. Für eine Injektion von 30 Sekunden ist das Volumen des Injektionspfropfens ca. 90 pl und für die gedrängte Injektion stabil, gegenüber ca. 300 pl und einem kontinuierlichen Anstieg mit der Zeit für eine erdfreie Injektion.

Durch Aufzeichnung des Trennkanals bei einem Punkt 0,9 cm von der Kreuzung 40B wurde die Reproduzierbarkeit für den Modus der gedrängten Injektion durch Integrieren des Bereichs des Bandenprofils nach dem Einbringen in den Trennkanal 34B getestet. Bei sechs Injektionen mit einer Dauer von 40 Sekunden ist die Reproduzierbarkeit für die gedrängte Injektion 0,7% RSD. Der größte Teil dieser gemessenen Instabilität stammt von dem optischen Meßsystem. Die gedrängte Injektion besitzt eine höhere Reproduzierbarkeit aufgrund der zeitlichen Stabilität des injizierten Volumens. Es wird erwartet, daß sich die RDS mit elektronisch gesteuerter Spannungsumschaltung für beide Systeme verbessert.

Die Injektionspfropfenbreite und schließlich die Auflösung zwischen Analyten hängt in großem Maße sowohl von dem Strömungsmuster des Analyten und den Dimensionen des Injektionskreuzes oder der Kreuzung 40B ab. Für diese Säule beträgt die Breite des Kanals an der Oberseite 90 µm, aber eine Kanalbreite von 10 µm ist realisierbar, was bei einer gedrängten Injektion zu einer Abnahme des Volumens des Injektionspfropfens von 90 pl herab bis auf 1 pl führen würde.

Es gibt Situationen, in denen es nicht erwünscht sein kann, den Fluß in dem Trennkanal umzukehren, wie es oben für die "gedrängten" und "erdfreien" Injektionssysteme beschrieben ist. Beispiele für solche Fälle können die Injektion eines neuen Probepfropfens, bevor der vorangegangene Pfropfen vollständig eluiert wurde, oder die Verwendung eines der Säule nachgeschalteten Reaktors, wo Reagens kontinuierlich in das Ende der Trennsäule injiziert wird, sein. Im letztgenannten Fall wäre es im allgemeinen nicht erwünscht, daß Reagens zurück in den Trennkanal fließt.

#### Alternativer Analytinjector

Figur 10 erläutert ein Analytinjectorsystem 10C, welches nicht der vorliegenden Erfindung entspricht, mit sechs verschiedenen Anschlüssen oder Kanälen 26C, 30C, 32C, 34C, 56 bzw. 58, die mit sechs verschiedenen Reservoirs 12C, 16C, 18C, 20C, 60 und 62 verbunden sind. Der Buchstabe C nach der Nummer jedes Elementes bedeutet, daß das angegebene Element zu den entsprechend nummerierten Elementen aus Figur 1 analog ist. Das Mikrochiplaborsystem 10C ist dahingehend den zuvor beschriebenen Laborsystemen 10, 10A und 10B ähnlich, daß ein Injektionskreuz oder eine Kreuzung 40C vorgesehen ist. In der Ausführungsform nach Figur 10 sind auch eine zweite Kreuzung 64 und zwei zusätzliche Reservoirs 60 und 62 vorgesehen, um die Probleme mit der Umkehrung des Flusses in dem Trennkanal zu überwinden.

Wie bei den vorangegangenen Ausführungsformen kann das Analytinjektorsystem 10C dazu verwendet werden, eine Analytentrennung durch Elektroforese oder Chromatographie zu implementieren oder Material in ein anderes verarbeitendes Element abzugeben. In dem Laborsystem 10C enthält das Reservoir 12C Trennpuffer, Reservoir 16C enthält den Analyten, und die Reservoirs 18C und 20C sind Abfallreservoirs. Die Kreuzung 40C wird vorzugsweise im gedrängten Modus betrieben, wie in der in Figur 6 gezeigten Ausführungsform. Die untere Kreuzung 64, die in einer Flüssigkeitsverbindung mit den Reservoirs 60 und 62 steht, wird dazu verwendet, einen zusätzlichen Fluß zu liefern, so daß ein kontinuierlicher Pufferstrom abwärts in Richtung des Abfallreservoirs 20C und, wenn es erforderlich ist, aufwärts in Richtung der Injektionskreuzung 40C gelenkt werden kann. Reservoir 60 und der verbundene Kanal 56 sind nicht notwendig, obwohl sie durch Reduzierung der Bandenverbreiterung, wenn ein Pfropfen die untere Kreuzung 64 passiert, die Leistung verbessern. In vielen Fällen wird der Fluß aus dem Reservoir 60 mit demjenigen aus Reservoir 62 symmetrisch sein.

Figur 11 ist eine vergrößerte Darstellung der zwei Kreuzungen 40C und 64. Die verschiedenen Arten von Pfeilen zeigen die Flußrichtungen unter bestimmten Umständen in der Zeit für die Injektion eines Pfropfens von Analyt in den Trennkanal. Die durchgezogenen Pfeile zeigen das anfängliche Strömungsmuster, bei dem der Analyt elektrokinetisch in die obere Kreuzung 40C gepumpt und durch Materialfluß aus den Reservoirs 12C, 60 und 62 in Richtung dieser gleichen Kreuzung "gedrängt" wird. Ein Fluß weg von der Injektionskreuzung 40C wird zu dem Analytenabfallreservoir 18C befördert. Der Analyt fließt auch aus dem Reservoir 16C zu dem Analytenabfallreservoir 18C. Unter diesen Umständen findet auch ein Fluß aus dem Reservoir 60 (und Reservoir 62) durch den Trennkanal 34C zu dem Abfallreservoir 20C statt. Solch ein Strömungsmuster wird durch gleichzeitiges Steuern der elektrischen Potentiale an allen sechs Reservoirs erzeugt.

Ein Pfropfen des Analyten wird durch die Injektionskreuzung 40C in den Trennkanal 34C durch Umschalten des Strömungsprofils injiziert, wie es durch die kurzgestrichelten Pfeile gezeigt ist. Puffer strömt aus dem Reservoir 12C abwärts zu der Injektionskreuzung 40C und in Richtung der Reservoirs 16C, 18C und 20C. Dieses Strömungsprofil drängt auch den Analytenpfropfen in Richtung des Abfallreservoirs 20C in den Trennkanal 34C, wie es zuvor beschrieben ist. Dieses Strömungsprofil wird für eine ausreichende zeitliche Länge gehalten, um den Analytenpfropfen über die untere Kreuzung 64 hinaus zu bewegen. Der Fluß von Puffer aus den Reservoirs 60 und 62 sollte gering sein, wie es durch den kurzen Pfeil angedeutet ist, und in den Trennkanal 34 erfolgen, um Störung zu minimieren.

Der Abstand zwischen den oberen und unteren Kreuzungen 40C bzw. 64 sollte so gering sein wie möglich, um eine Pfropfenstörung und die Kritizität der zeitlichen Koordinierung beim Umschalten zwischen den zwei Fließbedingungen zu minimieren. Elektroden zum Erfassen des elektrischen Potentials können ebenfalls an der unteren Kreuzung und in den Kanälen 56 und 58 angeordnet sein, um das Einstellen der elektrischen Potentiale für eine gute Flußsteuerung zu unterstützen. Genaue Flußsteuerung an der unteren Flußkreuzung 64 kann notwendig sein, um eine unerwünschte Bandenverbreiterung zu verhindern.

Nachdem der Probenpfropfen die untere Kreuzung passiert hat, werden die Potentiale zurück in die anfänglichen Zustände geschaltet, um das ursprüngliche Strömungsprofil zu liefern, wie es mit den langgestrichelten Pfeilen gezeigt ist. Dieses Strömungsmuster erlaubt, daß Puffer in den Trennkanal 34C fließt, während der nächste Analytenpfropfen zu dem pfropfenbildenden Bereich in der oberen Kreuzung 40C transportiert wird. Dieses Injektionssystem wird es erlauben, eine schnelle Abfolge von Injektionen durchzuführen, und kann sehr wichtig sein für Proben, die langsam wandern, oder wenn es eine lange Zeit erfordert, an der oberen Kreuzung 40C eine homogene Probe zu erhalten, wie mit verwickelten Polymerlösungen. Diese Implementierung der gedrängten Injektion hält auch einen unidirektionalen Fluß durch den Trennkanal aufrecht, wie es für eine der Säule nachgeschaltete Reaktion erforderlich sein könnte, was nachfolgend unter Bezugnahme auf Figur 22 diskutiert wird.

#### Gewundener Kanal

Ein Analytinjektorsystem 10D, auf welches die vorliegende Erfindung angewendet werden kann, ist in Figur 12 gezeigt. Das in Figur 12 gezeigte Laborsystem 10D ist im wesentlichen zu dem in Figur 6 gezeigten Laborsystem 10B identisch, mit der Ausnahme, daß der Trennkanal 34D einem gewundenen Weg folgt. Der gewundene Weg des Trennkanals 34D erlaubt es, die Länge des Trennkanals sehr stark zu erhöhen, ohne die Fläche des Substrats 49D, die benötigt wird, um den gewundenen Weg zu implementieren, wesentlich zu erhöhen. Eine Vergrößerung der Länge des Trennkanals 34D verbessert die Fähigkeit des Laborsystems 10D, Elemente eines Analyten zu unterscheiden. Bei einer speziellen Ausführung beträgt die eingeschlossene Länge (die von der Deckplatte 49D abgedeckt ist) des Kanals, der sich von Reservoir 16D zu Reservoir 18D erstreckt, 19 mm, während die Länge des Kanalabschnitts 26D 6,4 mm und des Kanals 34D 171 mm beträgt. Der Kurvenradius jeder Biegung des Kanals 34D, welcher als eine Trennsäule dient, beträgt 0,16 mm.

Um eine Trennung unter Verwendung des modifizierten Analytinjektorsystems 10D durchzuführen, wird ein Analyt zuerst in die Injektionskreuzung 40D eingebracht, wobei eine gesteuerte Verteilung gemäß der Erfindung oder eines der anderen oben beschriebenen Beladungsverfahren verwendet wird. Nachdem der Analyt in die Kreuzung 40D des Mikrochiplaborsystems 10 geladen wurde, werden die Spannungen vom Beladungsmodus in den Durchlauf- (Trennungs-) Betriebsmodus geschaltet. Die Figuren 13(a)-13(e) zeigen eine Trennung von Rhodamin B (weniger zurückgehalten) und Sulfhorhodamin (stärker zurückgehalten) unter Anwendung der folgenden Bedingungen:  $E_{inj} = 400 \text{ V/cm}$ ,  $E_{run} = 150 \text{ V/cm}$ , Puffer = 50 mM Natriumtetraborat mit einem pH-Wert von 9,2. Die CCD-Bilder zeigen das Trennverfahren in Intervallen von 1 Sekunde, wobei Figur 13(a) ein Schema des Abschnittes des abgebildeten Chips zeigt und wobei die Figuren 13(b)-13(e) die Entwicklung der Trennung zeigen.

Figur 13(b) zeigt wiederum die gedrängte Injektion, wobei die angelegten Spannungen an den Reservoirs 12D, 16D und 20D gleich sind und Reservoir 18D geerdet ist. Die Figuren 13(c)-13(e) zeigen den Pfropfen, der sich von der Kreuzung weg bewegt, 1, 2 bzw. 3 Sekunden nach dem Umschalten in den Durchlaufmodus. In Figur 13(c) wandert der Injektionspfropfen um eine 90°-

Biegung, und eine Bandenverzerrung ist sichtbar, weil der innere Bereich des Pfropfens eine geringere Distanz zurücklegt als der äußere Bereich. In Figur 13(d) haben sich die Analyten in deutliche Banden getrennt, welche in der Form eines Parallelogramms verzerrt sind. In Figur 13(e) sind die Banden gut getrennt und haben eine mehr rechteckige Form angenommen, d.h. ein Zusammenbruch des Parallelogramms aufgrund von radialer Diffusion, einem zusätzlichen Beitrag zu einem Effizienzverlust.

Wenn die Umschaltung von dem Beladungsmodus in den Durchlaufmodus durchgeführt wird, ist ein sauberer Abriß des Injektionspfropfens von dem Analytenstrom erwünscht, um ein Nachziehen zu vermeiden. Dies wird erreicht, indem man die mobile Phase oder den Puffer aus Kanal 26D gleichzeitig in die Kanäle 30D, 32D und 34D pumpt, indem man das Potential an der Kreuzung 40D unter dem Potential des Reservoirs 12D und über den Potentialen der Reservoirs 16D, 18D und 20D hält.

In den repräsentativen Experimenten, die hierin beschrieben sind, wurde die Kreuzung 40D während des Durchlaufmodus bei 66% des Potentials von Reservoir 12D gehalten. Dies lieferte ausreichenden Fluß des Analyten zurück und weg von der Kreuzung 40D entlang der Kanäle 30D und 32D, ohne die Feldstärke in dem Trennkanal 34D signifikant zu verringern. Alternative Kanalausgestaltungen würden es erlauben, daß ein größerer Anteil des an das Reservoir 12D angelegten Potentials über den Trennkanal 34D abfällt, wobei die Effizienz verbessert wird.

Dieser Dreiwegefluß ist in den Figuren 13(c)-13(e) demonstriert, wo die Analyten in den Kanälen 30D und 32D (links bzw. rechts) sich mit der Zeit weiter weg von der Kreuzung bewegen. Dreiwegefluß erlaubt gut definierte, reproduzierbare Injektionen unter minimalem Durchschlagen des Analyten in den Trennkanal 34D.

### Detektoren

Bei den meisten Anwendungen, die für diese integrierten Mikrosysteme zur chemischen Analyse oder Synthese ins Auge gefaßt werden, wird es notwendig sein, das in einem Kanal an einer oder mehreren Positionen vorhandene Material, ähnlich wie bei herkömmlichen Labormessverfahren, zu quantifizieren. Techniken, die typischerweise zur Quantifizierung verwendet werden, umfassen, sind jedoch nicht gesteuert auf optische Absorption, Veränderung des Brechungsindex, Fluoreszenzemission, Chemilumineszenz, verschiedene Formen von Raman-Spektroskopie, elektrische Leitfähigkeitsmessungen, elektrochemische amperometrische Messungen und Messungen der Schallwellenausbreitung.

Messungen der optischen Absorption werden üblicherweise mit herkömmlichen Laboranalysesystemen aufgrund der Allgemeingültigkeit des Phänomens im UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums durchgeführt. Die optische Absorption wird allgemein durch Messen der Dämpfung von auftretender optischer Energie bestimmt, wenn sie durch eine bekannte Länge eines Materials, das zu quantifizieren ist, hindurchtritt. Alternative Ansätze sind möglich mit Lasertechnologie, einschließlich photoakustischen und photothermischen Techniken. Solche Messungen können mit der hierin diskutierten Mikrochiptechnologie mit dem zusätzlichen Vorteil eingesetzt werden, daß opti-

sche Wellenleiter potentiell auf mikrotechnisch hergestellten Einrichtungen integriert werden. Die Verwendung von optischen Festkörperquellen, wie LEDs und Diodenlasern mit und ohne Frequenzumwandlungselementen, wäre für die Reduzierung der Systemgröße interessant. Eine Integration einer optischen Festkörperquelle und von Detektortechnologie auf einem Chip scheint derzeit nicht  
5   entwicklungsfähig zu sein, kann jedoch eines Tages von Interesse sein.

Brechungsindexdetektoren wurden ebenfalls allgemein für die Quantifizierung von chemischen Analysesystemen mit einem fließenden Strom aufgrund der Allgemeingültigkeit des Phänomens eingesetzt, waren jedoch typischerweise weniger empfindlich als optische Absorption. Auf Laser basierende Implementierungen der Brechungsindexdetektion könnten in einigen Fällen eine  
10   adäquate Empfindlichkeit liefern und haben den Vorteil der Einfachheit. Fluoreszenzemission (oder Fluoreszenzdetektion) ist eine äußerst empfindliche Detektionstechnik und wird allgemein für die Analyse von biologischen Materialien verwendet. Dieser Ansatz der Detektion hat besondere Relevanz für miniaturisierte chemische Analyse- und Synthesevorrichtungen aufgrund der Empfindlichkeit der Technik und der kleinen Volumina, die manipuliert und analysiert werden können (Volumina  
15   im Pikoliterbereich sind möglich). Zum Beispiel hätte ein 100 pl Probenvolumen mit 1 nM Konzentration an Analyt nur 60.000 zu verarbeitende und zu detektierende Analytenmoleküle. Es gibt mehrere Veranschaulichungen in der Literatur für die Detektion eines einzelnen Moleküls in Lösung durch Fluoreszenzdetektion. Häufig wird eine Laserquelle als die Anregungsquelle für ultrasensitive Messungen verwendet, jedoch werden herkömmliche Lichtquellen, wie Edelgasentladungslampen und  
20   lichtemittierende Dioden (LEDs) ebenfalls verwendet. Die Fluoreszenzemission kann durch ein Photomultiplerröhrchen, eine Photodiode oder einen anderen Lichtsensor erfaßt werden. Ein Felddetektor, wie ein Detektor mit ladungsgekoppeltem Bauelement (CCD), kann dazu verwendet werden, eine räumliche Verteilung eines Analyten abzubilden.

Raman-Spektroskopie kann als ein Detektionsverfahren für Mikrochipvorrichtungen verwendet werden mit dem Vorteil, daß molekulare Schwingungsinformation gewonnen wird, aber mit dem  
25   Nachteil relativ schlechter Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit wurde durch Effekte der oberflächenvergrößerten Raman-Spektroskopie (SERS) verbessert, aber nur auf dem Forschungsniveau. Ansätze der elektrischen oder elektrochemischen Detektion sind ebenfalls von besonderem Interesse für die Implementierung auf Mikrochipeinrichtungen aufgrund der Einfachheit der Integration auf  
30   einer mikrotechnisch hergestellten Struktur und der potentiell hohen Empfindlichkeit, die erreicht werden kann. Der allgemeinste Ansatz für elektrische Quantifizierung ist eine konduktometrische Messung, d.h. eine Messung der Leitfähigkeit in einer ionischen Probe. Das Vorhandensein eines ionisierten Analyten kann entsprechend die Leitfähigkeit eines Fluides erhöhen und erlaubt somit eine Quantifizierung. Amperometrische Messungen umfassen die Messung des Stroms durch eine  
35   Elektrode bei einem vorgegebenen elektrischen Potential aufgrund der Reduktion oder Oxidation eines Moleküls an der Elektrode. Eine gewisse Selektivität kann durch Steuerung des Potentials der Elektrode erreicht werden, jedoch ist sie minimal. Amperometrische Detektion ist eine weniger verbreitete Technik als Leitfähigkeit, weil nicht alle Moleküle innerhalb der begrenzten Potentiale, die mit herkömmlichen Lösungsmitteln eingesetzt werden können, reduziert oder oxidiert werden kön-

nen. Empfindlichkeiten im Bereich von 1 nM wurden in kleinen Volumina (10 nl) gezeigt. Der andere Vorteil dieser Technik ist, daß die Anzahl der gemessenen Elektronen (durch den Strom) gleich der Anzahl der vorhandenen Moleküle ist. Die für jedes dieser Detektionsverfahren erforderlichen Elektroden können durch photolithographische Mustergebung und Metallabscheidungsverfahren auf einem mikrotechnisch hergestellten Bauteil enthalten sein. Elektroden könnten auch dazu verwendet werden, ein Chemilumineszenzdetektionsverfahren zu initiieren, d.h. ein Molekül im angeregten Zustand wird über einen Oxidations-Reduktions-Prozeß erzeugt, welches dann seine Energie auf ein Analytenmolekül überträgt, welches anschließend ein Photon emittiert, das detektiert wird.

Akustische Messungen können ebenfalls zur Quantifizierung von Materialien verwendet werden, wurden jedoch bis heute nicht in breitem Maße eingesetzt. Ein Verfahren, das in erster Linie zur Gasphasendetektion verwendet wurde, ist die Dämpfung oder Phasenverschiebung einer Oberflächenakustikwelle (SAW). Adsorption von Material an der Oberfläche eines Substrates, wo sich eine SAW ausbreitet, beeinflußt die Ausbreitungscharakteristika und erlaubt eine Konzentrationsbestimmung. Selektive Sorptionsmittel auf der Oberfläche des SAW-Bauteils werden häufig verwendet. Ähnliche Techniken können in den hierin beschriebenen Vorrichtungen brauchbar sein.

Die Mischfähigkeiten der hierin beschriebenen Mikrochiplaborsysteme eignen sich für Detektionsverfahren, welche die Zugabe von einem oder mehreren Reagenzien umfassen. Derivatisierungsreaktionen werden allgemein in biochemischen Tests eingesetzt. Zum Beispiel werden Aminosäuren, Peptide und Proteine allgemein mit Dansylierungsreagenzien oder o-Phthaldialdehyd unter Herstellung von fluoreszierenden Molekülen, die einfach detektierbar sind, markiert. Alternativ könnte ein Enzym als ein Markierungsmolekül verwendet werden, und ein Reagens, einschließlich eines Substrats, könnte hinzugegeben werden, um ein enzymverstärktes Detektionssystem bereitzustellen, d.h. das Enzym produziert ein detektierbares Produkt. Es gibt viele Beispiele, wo solch ein Ansatz in herkömmlichen Laborverfahren eingesetzt wurde, um die Detektion entweder durch Absorption oder Fluoreszenz zu verstärken. Ein drittes Beispiel eines Detektionsverfahrens, das von integrierten Mischverfahren profitieren könnte, ist Chemilumineszenzdetektion. Bei diesen Arten von Detektionsszenarien werden ein Reagens und ein Katalysator mit einem geeigneten Zielmolekül gemischt, um ein Molekül im angeregten Zustand zu erzeugen, das ein detektierbares Photon emittiert.

#### Analytenanhäufung

Um die Empfindlichkeit des Mikrochiplaborsystems 10D zu erhöhen, kann vor der Trennung eine Analytenvorkonzentrierung durchgeführt werden. Konzentrationserhöhung ist ein nützliches Mittel, speziell wenn Umweltproben und biologische Materialien, zwei Gebiete, die von der Mikrochiptechnologie angesprochen werden, analysiert werden. Analytenanhäufung ist eine vorteilhafte Technik zur Verbindung mit elektroforetischen Analysen. Zur Durchführung von Analytenanhäufung wird der Analyt in einem Puffer mit einer niedrigeren Leitfähigkeit als der Trennpuffer bereitgestellt. Der Unterschied in der Leitfähigkeit bewirkt, daß sich die Ionen in dem Analyten am Anfang oder Ende des Analytenpfropfens anhäufen, was zu einem konzentrierten Analytenpfropfbereich führt,



der leichter detektiert werden kann. Aufwendigere Vorkonzentrierungstechniken umfassen Zwei- und Dreipuffersysteme, d.h. transiente isotachoretische Vorkonzentrierung. Es ist klar, daß es umso schwieriger ist, die Injektionstechnik zu implementieren, je größer die Anzahl der involvierten Lösungen ist. Vorkonzentrierungsstufen sind gut geeignet für eine Implementierung auf einem Mikrochip.

- 5 Elektroosmotisch angetriebener Fluß ermöglicht, daß Trenn- und Probenpuffer ohne die Verwendung von Ventilen oder Pumpen gesteuert werden können. Verbindungen mit geringem Totvolumen zwischen Kanälen können einfach hergestellt werden und ermöglichen eine Fluidmanipulation mit hoher Genauigkeit, Geschwindigkeit und Reproduzierbarkeit.

Unter erneuter Bezugnahme auf Figur 12 wird die Vorkonzentrierung des Analyten an der Oberseite des Trennkanals 34D durchgeführt, wobei eine modifizierte gesteuerte Injektion verwendet wird, um den Analyten anzuhäufen. Zuerst wird ein Analytenpfropfen unter Verwendung von elektroosmotischem Fluß auf den Trennkanal 34D gebracht. Dem Analytenpfropfen folgt dann mehr Trennpuffer aus dem Pufferreservoir 16D. An diesem Punkt häuft sich der Analyt an den Grenzen des Analyten und des Trennpuffers an. Es wurden dansylierte Aminosäuren als Analyt verwendet, welche Anionen sind, die sich an der hinteren Grenze des Analytenpufferpfropfens anhäufen. Eine Implementierung der Analytenanhäufung wird zusammen mit den Wirkungen der Anhäufung sowohl auf die Trenneffizienz als auch die Detektionsgrenzen beschrieben.

Für die Anwendung einer gesteuerten Injektion unter Verwendung des Mikrochiplaborsystems 10D wird der Analyt in dem oberen Reservoir 12D und der Puffer in dem linken Reservoir 16D gespeichert. Die gesteuerte Injektion, die für die Analytenanhäufung verwendet wird, wird mit einem Analyten mit einer Ionenstärke, die geringer ist als diejenige des Laufpuffers, durchgeführt. Puffer wird durch Elektroosmose aus dem Pufferreservoir 16D in Richtung sowohl des Analytenabfall- als auch des Abfallreservoirs 18D, 20D transportiert. Dieser Pufferstrom verhindert, daß der Analyt in den Trennkanal 34D ausläuft. In einer repräsentativen Ausführungsform betragen die relativen Potentiale an den Puffer-, Analyten-, Analytenabfall- und Abfallreservoirs, 1, 0,9, 0,7 bzw. 0. Für 1 kV, die an den Mikrochip angelegt sind, betragen die Feldstärken in den Puffer-, Analyten-, Analytenabfall- und Trennkanälen während der Trennung 170, 130, 180 bzw. 120 V/cm.

Zur Injektion des Analyten auf den Trennkanal 34D wird das Potential an dem Pufferreservoir 16D für eine kurze Zeitdauer (0,1 bis 10 Sekunden) erdfrei geschaltet (Öffnen des Hochspannungsschalters), und Analyt wandert in den Trennkanal. Für 1 kV, die an den Mikrochip angelegt sind, betragen die Feldstärken in den Puffer-, Proben-, Probenabfall- und Trennkanälen während der Injektion 0, 240, 120 bzw. 110 V/cm. Zum Abreißen des Analytenpfropfens wird das Potential an dem Pufferreservoir 16D erneut angelegt (Schließen des Hochspannungsschalters). Das Volumen des Analytenpfropfens ist eine Funktion der Injektionszeit, der elektrischen Feldstärke und der elektroforetischen Mobilität.

Die Zusammensetzungen des Trennpuffers und des Analyten können ziemlich verschieden sein, jedoch kann mit den gesteuerten Injektionen die Integrität sowohl des Analyten- als auch des Pufferstroms zur Durchführung des Anhäufungsvorgangs alternativ in dem Trennkanal 34D aufrechterhalten werden. Die Analytenanhäufung hängt von der relativen Leitfähigkeit  $\gamma$  des Trennpuf-

fers gegenüber dem Analyten ab. Zum Beispiel ist  $\gamma = 9,7$  bei einem 5 mM Trennpuffer und einer 0,516 mM Probe (0,016 mM Dansyl-Lysin und 0,5 mM Probenpuffer). Figur 14 zeigt zwei Injektionsprofile für Didansyl-Lysin, das für 2 Sekunden mit  $\gamma = 0,97$  und 9,7 injiziert wurde. Das Injektionsprofil mit  $\gamma = 0,97$  (wobei die Trenn- und Probenpuffer beide 5 mM sind) zeigt keine Anhäufung. Das zweite Profil mit  $\gamma = 9,7$  zeigt eine mäßige Erhöhung um 3,5 für die relativen Peakhöhen gegenüber der Injektion mit  $\gamma = 0,97$ . Didansyl-Lysin ist ein Anion und häuft sich somit an der hinteren Grenze des Probenpufferpfropfens an. Zusätzlich zur Erhöhung der Analytenkonzentration wird die räumliche Erstreckung des Pfropfens begrenzt. Das Injektionsprofil mit  $\gamma = 9,7$  hat eine Breite bei halber Höhe von 0,41 s, wogegen das Injektionsprofil mit  $\gamma = 0,97$  eine Breite bei halber Höhe von 1,88 s aufweist. Die elektrische Feldstärke in dem Trennkanal 34D während der Injektion (Injektionsfeldstärke) ist 95% der elektrischen Feldstärke in dem Trennkanal während der Trennung (Trennungsfeldstärke). Diese Profile werden gemessen, während die Trennfeldstärke angelegt ist. Für eine Injektionszeit von 2 Sekunden wird für  $\gamma = 0,97$  eine Injektionspfropfenbreite von 1,9 s erwartet.

Die Konzentrationserhöhung aufgrund von Anhäufung wurde für mehrere Probenpfropfenlängen und relative Leitfähigkeiten des Trennpuffers und des Analyten bestimmt. Die Erhöhung aufgrund von Anhäufung steigt mit zunehmenden relativen Leitfähigkeiten  $\gamma$  an. In Tabelle 1 ist die Erhöhung für  $\gamma$  von 0,97 bis 970 aufgelistet. Obwohl die Erhöhung am größten ist, wenn  $\gamma = 970$ , leidet die Trenneffizienz aufgrund eines elektroosmotischen Druckes, der von der Konzentrationsgrenze herrührt, wenn die relative Leitfähigkeit zu groß ist. Es muß ein Kompromiß zwischen der Anreicherungsverstärkung und der Trenneffizienz erreicht werden, und es wurde herausgefunden, daß  $\gamma = 10$  optimal ist. Für Trennungen, die unter Verwendung von angehäuften Injektionen mit  $\gamma = 97$  und 970 durchgeführt wurden, konnten Didansyl-Lysin und Dansyl-Isoleucin aufgrund eines Effizienzverlustes nicht aufgelöst werden. Auch weil der Injektionsvorgang auf dem Mikrochip computergesteuert ist und die Säule nicht physikalisch von Gefäß zu Gefäß transportiert wird, beträgt die Reproduzierbarkeit der angehäuften Injektionen 2,1% RSD (% relative Standardabweichung) für einen Peakbereich bei sechs wiederholten Analysen. Zum Vergleich hat eine nicht gehäuften, gesteuerte Injektion eine RSD von 1,4% für einen Peakbereich von sechs wiederholten Analysen, und die gedrängte Injektion hat eine RSD von 0,75% für einen Peakbereich von sechs wiederholten Analysen. Dies entspricht gut beschriebenen Werten für in großem Maßstab arbeitenden, handelsüblichen, automatisierten Kapillarelektroforeseinstrumenten. Jedoch sind Injektionen, die auf dem Mikrochip durchgeführt werden,  $\approx 100$ -mal kleiner im Volumen, z.B. 100 pl auf dem Mikrochip gegenüber 10 nl auf einem handelsüblichen Instrument.

**Tabelle 1:** Veränderung der Anreicherungsverstärkung mit der relativen Leitfähigkeit  $\gamma$

$\gamma$	Konzentrationserhöhung
0,97	1
9,7	6,5

97	11,5
970	13,8

Pufferströme von verschiedenen Leitfähigkeiten können auf Mikrochips genau kombiniert werden. Hierin beschrieben ist ein einfaches Anhäufungsverfahren, obwohl aufwendigere Anhäufungssystemen durch Herstellung eines Mikrochips mit zusätzlichen Pufferreservoirs eingesetzt werden können. Darüber hinaus können die vorlaufenden und nachlaufenden Elektrolytpuffer so ausgewählt werden, daß sie die Probenanhäufung verstärken und schließlich die Detektionsgrenzen unter die hierin gezeigten absenken. Es wird auch erwähnt, daß viel größere Verstärkungen für anorganische (elementare) Kationen aufgrund der Kombination von feldverstärkter Analyteninjektion und besserer Übereinstimmung von Analyten- und Pufferionenmobilitäten erwartet werden.

Unabhängig davon, ob Probenhäufung verwendet wird, kann das Mikrochiplaborsystem 10D aus Figur 12 dazu verwendet werden, elektroforetische Trennung eines Analyten, der aus Rhodamin B und Sulforhodamin zusammengesetzt ist, zu erreichen. Figur 15 zeigt Elektroferogramme bei (a) 3,3 cm, (b), 9,9 cm und (c) 16,5 cm vom Injektionspunkt für Rhodamin B (geringer zurückgehalten) und Sulforhodamin (stärker zurückgehalten). Diese wurden unter Anwendung der folgenden Bedingungen aufgenommen: Der Injektionstyp war gedrängt,  $E_{inj} = 500 \text{ V/cm}$ ,  $E_{run} = 170 \text{ V/cm}$ , Puffer = 50 mM Natriumtetraborat mit einem pH-Wert von 9,2. Um Elektroferogramme in der herkömmlichen Art und Weise zu erhalten, wurde Einzelpunktdetektion mit dem Helium-Neon-Laser (grüne Linie) an verschiedenen Stellen entlang der Achse des Trennkanals 34D eingesetzt.

Ein wichtiges Maß für die Brauchbarkeit eines Trennsystems ist die Anzahl an Böden, die pro Zeiteinheit erzeugt werden, angegeben durch die Formel

$$N/t = L/(Ht),$$

worin N die Anzahl der theoretischen Böden, t die Trennungszeit, L die Länge der Trennsäule und H das Höhenäquivalent für einen theoretischen Boden ist. Die Bodenhöhe H kann angegeben werden als

$$H = A + B/u,$$

worin A die Summe der Beiträge der Injektionspfropfenlänge und der Detektorweglänge, B gleich  $2D_m$ , worin  $D_m$  der Diffusionskoeffizient für den Analyten in dem Puffer ist, und u die lineare Geschwindigkeit des Analyten ist.

Kombiniert man die zwei oben genannten Gleichungen und ersetzt  $u = \mu E$ , worin  $\mu$  die effektive elektroforetische Mobilität des Analyten und E die elektrische Feldstärke ist, können die Böden pro Zeiteinheit als eine Funktion der elektrischen Feldstärke ausgedrückt werden:

$$N/t = (\mu E)^2 / (A\mu E + B).$$

Bei niedrigen elektrischen Feldstärken, wenn die axiale Diffusion die überwiegende Form der Bandendispersion ist, ist der Ausdruck  $A\mu E$  klein gegenüber  $B$ , und folglich steigt die Anzahl der Böden pro Sekunde mit dem Quadrat der elektrischen Feldstärke.

5 Wenn die elektrische Feldstärke ansteigt, nähert sich die Bodenhöhe einem konstanten Wert, und die Böden pro Zeiteinheit steigen linear mit der elektrischen Feldstärke an, weil  $B$  gegenüber  $A\mu E$  klein ist. Es ist daher vorteilhaft,  $A$  so gering wie möglich zu haben, ein Vorteil des gedrängten Injektionssystems.

Die Effizienz der elektroforetischen Trennung von Rhodamin B und Sulforhodamin an zehn  
10 gleichmäßig verteilten Positionen wurde aufgezeichnet, wobei jede ein getrenntes Experiment darstellt. 16,5 cm vom Injektionspunkt betragen die Effizienzen von Rhodamin B und Sulforhodamin 38.100 bzw. 29.000 Böden. Effizienzen von dieser Höhe sind für viele Trennungsanwendungen ausreichend. Die Linearität der Daten liefert Information über die Gleichmäßigkeit und Qualität des Kanals entlang seiner Länge. Wenn in dem Kanal ein Defekt, z.B. eine Vertiefung, vorhanden wäre,  
15 würde dies zu einer scharfen Abnahme der Effizienz führen, jedoch wurde keine festgestellt. Die Effizienzdaten sind in Figur 16 aufgetragen (die Bedingungen für Figur 16 waren die gleichen wie für Figur 15).

Ein ähnliches Trennungsexperiment wurde unter Verwendung des Mikrochipanalytinkjektors  
20 10B aus Figur 6 durchgeführt. Aufgrund des geraden Trennkanals 34B ermöglicht der Analytinkjektor 10B schnellere Trennungen, als sie unter Verwendung des gewundenen Trennkanals 34D des in Figur 12 gezeigten alternativen Analytinkjektors 10D möglich sind. Darüber hinaus waren die verwendeten elektrischen Feldstärken höher (470 V/cm und 100 V/cm für den Puffer bzw. die Trennkanäle 26B, 34B), was die Geschwindigkeit der Trennungen weiter erhöhte.

Ein besonderer Vorteil des ebenen Mikrochiplaborsystems 10B der vorliegenden Erfindung  
25 besteht darin, daß man mit laserinduzierter Fluoreszenz den Punkt der Detektion irgendwo entlang der Trennsäule plazieren kann. Die Elektroferogramme werden bei Trennlängen von 0,9 mm, 1,6 mm und 11,1 mm von der Injektionskreuzung 40B erfaßt. Die Trennlängen von 1,6 mm und 11,1 mm wurden über einen Bereich von elektrischen Feldstärken von 0,06 bis 1,5 kV/cm verwendet, und die Trennungen hatten eine Grundlinienauflösung über diesen Bereich. Bei einer elektrischen Feldstärke  
30 ke von 1,5 kV/cm werden die Analyten, Rhodamin B und Fluoreszein, in weniger als 150 ms für die Trennlänge von 0,9 mm aufgelöst, wie es in Figur 17(a) gezeigt ist, in weniger als 260 ms für die 1,6 mm Trennlänge, wie es in Figur 17(b) gezeigt, und in weniger als 1,6 Sekunden für die Trennlänge von 11,1 mm, wie es in Figur 17(c) gezeigt ist.

Aufgrund der trapezförmigen Geometrie der Kanäle machen es die oberen Ecken schwierig,  
35 den Probenpfropfen präzise wegzuschneiden, wenn die Potentiale von dem Probenbeladungsmodus in den Trennmodus geschaltet werden. Daher hat der Injektionspfropfen einen geringfügigen Schweif, der mit ihm verbunden ist, und dieser Effekt trägt wahrscheinlich zu dem Nachziehen bei, das man in den getrennten Peaks beobachtet.

In Figur 18 ist die Anzahl der Böden pro Sekunde für die Trennlängen von 1,6 mm und 11,1 mm gegenüber der elektrischen Feldstärke aufgetragen. Die Anzahl der Böden pro Sekunde wird schnell eine lineare Funktion der elektrischen Feldstärke, weil sich die Bodenhöhe einem konstanten Wert annähert. Die Symbole in Figur 18 repräsentieren die experimentellen Daten, die für die zwei Analyten bei den Trennlängen von 1,6 mm und 11,1 mm gesammelt wurden. Die Linien sind unter Verwendung der zuvor angegebenen Gleichung berechnet, und die Koeffizienten sind experimentell bestimmt. Man sieht eine geringfügige Abweichung zwischen den experimentellen Daten und den berechneten Zahlen für Rhodamin B bei der Trennlänge von 11,1 mm. Dies ist in erster Linie auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen.

### Elektrochromatographie

Ein Problem der Elektroforese für allgemeine Analysen ist ihr Unvermögen, ungeladene Spezies aufzutrennen. Alle neutralen Spezies in einer bestimmten Probe werden keine elektroforetische Mobilität besitzen und somit die gleiche Migrationszeit. Der in Figur 12 gezeigte Mikrochipanalytinjector 10D kann auch dazu verwendet werden, Elektrochromatographie zur Trennung von nicht-ionischen Analyten durchzuführen. Zur Durchführung dieser Elektrochromatographie wurde die Oberfläche des Trennkanals 34D durch chemische Bindung einer Umkehrphasenbeschichtung an die Wände des Trennkanals nach dem Verbinden der Deckplatte mit dem Substrat zum Einschließen der Kanäle präpariert. Der Trennkanal wurde mit 1 M Natriumhydroxid behandelt und anschließend mit Wasser gespült. Der Trennkanal wurde bei 125°C für 24 Stunden getrocknet, während mit Helium bei einem Manometerdruck von etwa 50 kPa gespült wurde. Eine 25%-ige (w/w) Lösung von Chlordimethyloctadecylsilan (CDS, Aldrich) in Toluol wurde in den Trennkanal mit einem Überdruck an Helium von etwa 90 kPa geladen. Das ODS/Toluol-Gemisch wurde kontinuierlich in die Säule während der 18 Stunden Reaktionsdauer bei 125°C gepumpt. Die Kanäle werden mit Toluol und anschließend mit Acetonitril gespült, um nicht umgesetztes ODS zu entfernen. Das Laborsystem 10D wurde zur Durchführung von Elektrochromatographie an einem Analyten verwendet, der aus Cumarin 440 (C440), Cumarin 450 (C450) und Cumarin 460 (C460; Exciton Chemicals Co., Inc.) mit 10 µM für die direkten Fluoreszenzmessungen der Trennungen und 1 µM für die indirekten Fluoreszenzmessungen der Totzeit zusammengesetzt war. Der Puffer war ein Natriumtetraboratpuffer (10 mM, pH 9,2) mit 25% (v/v) Acetonitril.

Der Analytinjector 10D wurde mit einem gedrängten Analytbeladungsmodus und einem Trenn- (Durchlauf-) Modus betrieben, wie sie oben unter Bezugnahme auf Figur 6 beschrieben sind (was nicht erfindungsgemäß ist). Der Analyt wird in das Injektionskreuz über ein frontales Chromatogramm, welches von dem Analytenreservoir 16D zu dem Analytenabfallreservoir 18D befördert wird, beladen, und sobald die Front des langsamsten Analyten durch die Injektionskreuzung 40D hindurchtritt, ist die Probe bereit, analysiert zu werden. Zum Umschalten in den Trennmodus werden die angelegten Potential rekonfiguriert, z.B. durch manuelles Umwerfen eines Schalters. Nach dem Schalten der angelegten Potentiale ist der primäre Fließweg für die Trennung von dem Pufferreservoir 12D zu dem Abfallreservoir 20D. Um einen kleinen Analytenpfropfen in den Trennkanal 34D zu

injizieren und zu verhindern, daß der überschüssige Analyt in den Trennkanal ausläuft, werden die Analyten- und Analytenabfallreservoirs 16D, 18D bei 57% des an das Pufferreservoir 12D angelegten Potentials gehalten. Dieses Verfahren zur Beladung und Injektion der Probe ist zeitunabhängig, nicht vorgespannt und reproduzierbar.

In Figur 19 ist ein Chromatogramm der Cumarine für eine lineare Geschwindigkeit von 0,65 mm/s gezeigt. Für C440 wurden 11.700 Böden beobachtet, was 120 Böden/s entspricht. Der am stärksten zurückgehaltene Bestandteil, C460, besitzt eine Effizienz nahezu um eine Größenordnung geringer als für C440, welche 1.290 Böden betrug. Der wellenförmige Hintergrund in den Chromatogrammen ist auf Hintergrundfluoreszenz von dem Glassubstrat zurückzuführen und zeigt die Energieinstabilität des Lasers. Dies beeinträchtigte jedoch nicht die Qualität der Trennungen oder der Detektion. Diese Ergebnisse lassen sich ziemlich gut mit herkömmlichen Hochleistungs-LC- (HPLC-) Labortechniken bezüglich der Olat-Zahlen vergleichen und übertreffen HPLC in der Geschwindigkeit um einen Faktor von 10. Die Effizienz nimmt mit der Zurückhaltung schneller ab, als man es anhand der Theorie vorhergesagt hätte. Dieser Effekt kann auf eine Überladung der stationären oder kinetischen Effekte der Einzellage aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Trennung zurückzuführen sein.

#### Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie

In den oben unter Bezugnahme auf Figur 19 diskutierten elektrochromatographischen Experimenten wurden Probenbestandteile aufgrund ihrer Aufteilungswechselwirkung mit einer stationären Phase, mit der die Kanalwände beschichtet waren, getrennt. Ein anderes Verfahren zum Trennen von neutralen Analyten ist mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC). MECC ist eine Betriebsweise der Elektroforese, bei der ein Detergens, wie Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer ausreichenden Konzentration zur dem Puffer hinzugegeben wird, so daß in dem Puffer Mizellen gebildet werden. In einer typischen experimentellen Anordnung bewegen sich die Mizellen viel langsamer in Richtung der Kathode als die umgebende Pufferlösung. Die Aufteilung der gelösten Stoffe zwischen den Mizellen und der umgebenden Pufferlösung liefert einen Trennungsmechanismus, ähnlich demjenigen von Flüssigchromatographie.

Das Mikrochiplaborsystem 10D aus Figur 12 wurde verwendet, um dies an einem Analyten durchzuführen, der aus neutralen Farbstoffen Cumarin 440 (C440), Cumarin 450 (C450) und Cumarin 460 (C460, Exciton Chemical Co., Inc.) zusammengesetzt war. Einzelne Stammlösungen jedes Farbstoffs wurden in Methanol hergestellt und anschließend vor der Verwendung in dem Analysepuffer verdünnt. Die Konzentration jedes Farbstoffs betrug etwa 50 µM, wenn es nicht anders angegeben ist. Der MECC-Puffer bestand aus 10 mM Natriumborat (pH 9,1), 50 mM SDS und 10% (v/v) Methanol. Der Methanol unterstützt das Lösen des Cumarin-Farbstoffs in dem wäßrigen Puffersystem und bewirkt auch die Aufteilung von einigen der Farbstoffe in die Mizellen. Beim Arbeiten mit Cumarin-Farbstoffen ist Vorsicht walten zu lassen, da die chemischen, physikalischen und toxikologischen Eigenschaften dieser Farbstoffe noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Das Mikrochiplaborsystem 10D wurde in dem "gedrängten Injektionsmodus" betrieben, der zuvor beschrieben wurde (welcher nicht Gegenstand der Erfindung ist). Die an die Reservoirs angelegten Spannungen werden entweder auf einen Beladungsmodus oder einen "Betriebs"- (Trennungs-) Modus eingestellt. In dem Beladungsmodus wird ein frontales Chromatogramm der Lösung in dem Analytenreservoir 16D elektroosmotisch durch die Kreuzung und in das Analytenabfallreservoir 18D gepumpt. Spannungen, die an die Puffer- und Abfallreservoirs angelegt sind, bewirken auch schwache Ströme in die Kreuzung von den Seiten und anschließend in das Analytenabfallreservoir 18D. Der Chip bleibt in diesem Modus, bis die sich am langsamsten bewegendende Komponente des Analyten durch die Kreuzung 40D hindurchgetreten ist. An diesem Punkt ist der Analytenpfropfen in der Kreuzung für die Analytenlösung ohne elektrokinetische Vorspannung repräsentativ.

Eine Injektion wird vorgenommen, indem man den Chip in den "Betriebs"-Modus umschaltet, wobei die an die Reservoirs angelegten Spannungen so verändert werden, daß Puffer nun aus dem Pufferreservoir 12D durch die Kreuzung 40D in den Trennkanal 34D zu dem Abfallreservoir 20D fließt. Der Pfropfen aus Analyt, der in der Kreuzung 40D war, wird in den Trennkanal 34D gespült. Entsprechend geringere Spannungen werden an die Analyten- und Analytenabfallreservoirs 16D, 18D angelegt, um einen schwachen Fluß von Puffer aus dem Pufferreservoir 12D in diese Kanäle zu bewirken. Diese Ströme stellen sicher, daß der Probenpfropfen sauber von dem Analytenstrom "abreißt" und daß kein überschüssiger Analyt während der Analyse in den Trennkanal ausläuft.

Die Ergebnisse der MECC-Analyse eines Gemisches aus C440, C450 und C460 sind in Figur 20 gezeigt. Die Peaks wurden durch Einzelanalysen jedes Farbstoff identifiziert. Die Migrationszeitstabilität des ersten Peaks, C440, bei veränderter Methanolkonzentration war ein starkes Anzeichen dafür, daß dieser Farbstoff sich nicht in einem signifikanten Ausmaß in die Mizellen verteilte. Daher wurde er als ein Marker für den elektroosmotischen Fluß mit einer Migrationszeit  $t_0$  angesehen. Der letzte Peak, C460, wurde als ein Marker für die mizellare Migrationszeit  $t_m$  angesehen. Unter Verwendung dieser Werte von  $t_0$  und  $t_m$  aus den Daten in Figur 20 beträgt der berechnete Elutionsbereich  $t_0/t_m$  0,43. Dies stimmt gut mit einem Literaturwert von  $t_0/t_m = 0,4$  für ein ähnliches Puffersystem überein und unterstützt unsere Annahme. Diese Ergebnisse sind gut vergleichbar mit herkömmlicher MECC, die in Kapillaren durchgeführt wird, und zeigt auch einige Vorteile gegenüber dem oben beschriebenen elektrochromatographischen Experiment dahingehend, daß die Effizienz mit dem Rückhalteverhältnis erhalten bleibt. Weitere Vorteile dieses Ansatzes zur Trennung neutraler Spezies sind, daß keine Oberflächenmodifikation der Wände notwendig ist und daß die stationäre Phase während der Experimente kontinuierlich erneuert wird.

#### Analyse anorganischer Ionen

Eine weitere Laboranalyse, die entweder auf dem Laborsystem 10B aus Figur 6 oder dem Laborsystem 10D aus Figur 12 durchgeführt werden kann, ist die Analyse von anorganischen Ionen. Unter Verwendung des Laborsystems 10B aus Figur 6 wurde Analyse von anorganischen Ionen an Metallionen, die mit 8-Hydroxychinolin-5-sulfonsäure (HQS) komplexiert waren, welche durch Elek-

troforese getrennt und mit durch UV-Laser induzierter Fluoreszenz detektiert werden, durchgeführt. HQS wurde in weitem Maße als ein Ligand für optische Bestimmungen von Metallionen verwendet. Die optischen Eigenschaften und die Löslichkeit von HQS in wäßrigen Medien wurden kürzlich für die Detektion von Metallionen verwendet, die durch Ionenchromatographie und Kapillarelektroforese  
5 getrennt wurden. Weil nicht komplexierte HQS nicht fluoresziert, wird ein Überschuß an Ligand zu dem Puffer hinzugegeben, um das Komplexierungsgleichgewicht während der Trennung aufrechtzuerhalten, ohne zu einem großen Hintergrundsignal beizutragen. Dies ist sowohl für die Effizienz der Trennung als auch die Detektierbarkeit der Probe vorteilhaft. Die Verbindungen, die für die Experimente verwendet werden, sind Zinksulfat, Cadmiumnitrat und Aluminiumnitrat. Der Puffer ist  
10 Natriumphosphat (60 mM, pH 6,9) mit 8-Hydroxychinolin-5-sulfonsäure (20 mM für alle Experimente, ausgenommen Figur 5; Sigma Chemical Co.). Wenigstens 50 mM Natriumphosphatpuffer werden benötigt, um bis zu 20 mM HQS zu lösen. Das verwendete Substrat 49B war Glasquarz, welches eine größere Sicht bietet als Glassubstrate.

Die erdfreie oder gedrängte Analytenbeladung, wie sie zuvor unter Bezugnahme auf Figur 6  
15 beschrieben ist (welche nicht erfindungsgemäß ist), wird zum Transportieren des Analyten zu der Injektionskreuzung 40B verwendet. Mit der erdfreien Probenbeladung hat der injizierte Pfropfen keine elektroforetische Vorspannung, aber das Volumen der Probe ist eine Funktion der Probenbeladungszeit. Weil die Probenbeladungszeit umgekehrt proportional zu der eingesetzten Feldstärke ist, wird für hohe Injektionsfeldstärken eine kürzere Injektionszeit als für niedrige Injektionsfeldstärken  
20 verwendet. Zum Beispiel beträgt für eine Injektionsfeldstärke von 630 V/cm (Figur 3a) die Injektionszeit 12 Sekunden, und für eine Injektionsfeldstärke von 520 V/cm (Figur 3b) beträgt die Injektionszeit 14,5 Sekunden. Sowohl die gedrängte als auch die erdfreie Probenbeladung kann mit und ohne Unterdrückung des elektroosmotischen Flusses verwendet werden.

Die Figuren 21(a) und 21(b) zeigen die Trennung von drei Metallionen, die mit 8-  
25 Hydroxychinolin-5-sulfonsäure komplexiert sind. Alle drei Komplexe haben eine negative Nettoladung. Mit dem durch die kovalente Bindung von Polyacrylamid an die Kanalwände minimierten elektroosmotischen Fluß werden gegenüber der Erdung negative Potentiale verwendet, um die Komplexe während der Probenbeladung und -trennung zu manipulieren. In den Figuren 21(a) und 21(b) ist die Trennkanalfeldstärke 870 bzw. 720 V/cm, und die Trennungslänge beträgt 16,5 mm. Das Volumen des injizierten Pfropfens ist 120 pl, was 16, 7 und 19 injizierten fmol für Zn, Cd bzw. Al für Figur  
30 4(a) entspricht. In Figur 4(b) wurden 0,48, 0,23 bzw. 0,59 fmol Zn, Cd bzw. Al auf die Trennsäule injiziert. Die durchschnittliche Reproduzierbarkeit der injizierten Mengen beträgt 1,6% RSD (% relative Standardabweichung), gemessen anhand von Peakflächen (sechs wiederholte Analysen). Die Stabilität des zur Anregung der Komplexe verwendeten Lasers beträgt  $\approx$  1% RSD. Die Detektions-  
35 grenzen liegen in einem Bereich, wo brauchbare Analysen durchgeführt werden können.

#### Dem Trennkanal nachgeschalteter Reaktor gemäß der vorliegenden Erfindung

Ein Mikrochiplaborsystem 10E gemäß der Erfindung ist in Figur 22 gezeigt. Das Muster der Kanäle mit fünf Anschlüssen ist auf einem Substrat 49E mit einem Deckglas 49E' verteilt, wie in den



zuvor beschriebenen Ausführungsformen. Die Ausführungsform des Mikrochiplaborsystems 10E wurde unter Verwendung von standardphotolithographischen, naßchemischen Ätz- und Bindungstechniken hergestellt. Eine Photomaske wurde durch Besputtern von Chrom (50 nm) auf einen Glasobjektträger und Abtragen der Kanalausgestaltung in den Chromfilm mittels eines CAD/CAM-Laserverdampfungssystems (Resonetics, Inc.) hergestellt. Das Kanaldesign wurde dann unter Verwendung eines positiven Photoresists auf das Substrat übertragen. Die Kanäle wurden in einem verdünnten HF/NH<sub>4</sub>F-Bad in das Substrat geätzt. Zur Ausbildung des Trennkanals 34E wurde eine Deckplatte unter Verwendung einer direkten Verbindungstechnik über den geätzten Kanälen mit dem Substrat verbunden. Die Oberflächen wurden in verdünnter NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hydrolysiert, in entionisiertem, gefiltertem H<sub>2</sub>O gespült, miteinander verbunden und anschließend bei 500°C getempert. Zylindrische Glasreservoirs wurden unter Verwendung von RTV-Silikon (hergestellt von General Electric) an dem Substrat befestigt. Platinelektroden stellten elektrischen Kontakt von dem Spannungsregler 46E (Spellman CZE1000R) zu den Lösungen in den Reservoirs her.

Der Kanal 26E ist bei einer Ausführungsform von dem ersten Reservoir 12E zu der Kreuzung 40E 2,7 mm lang, während der Kanal 30E 7 mm und der dritte Kanal 32E 6,7 mm lang sind. Der Trennkanal 34E ist aufgrund der Hinzufügung eines Reagenzienreservoirs 22E, welches einen Reagenzienkanal 36E aufweist, der den Trennkanal 34E an einem Misch-T 44E verbindet, modifiziert, so daß er nur 7,0 mm lang ist. Daher wird die Länge des Trennkanals 34E von der Kreuzung 40E bis zu dem Misch-T 44E gemessen. Der Kanal 56, der sich von dem Misch-T 44E zu dem Abfallreservoir 20E erstreckt, ist die Reaktionssäule oder der Reaktionskanal, und bei der dargestellten Ausführungsform ist dieser Kanal 10,8 mm lang. Die Länge des Reagenzienkanals 36E beträgt 11,6 mm.

In einem repräsentativen Beispiel wurde die Ausführungsform gemäß Figur 22 verwendet, um einen Analyten aufzutrennen, und die Trennung wurde mittels Fluoreszenz unter Verwendung eines Argonionenlasers (351,1 nm, 50 mW, Coherent Innova 90) für die Anregung auf dem Mikrochip aufgezeichnet. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem Photomultiplerröhrchen (PMT, Oriel 77340) für die Punkterfassung und einem ladungsgekoppelten Bauelement (CCD, Princeton Instruments, Inc. TE/CCD-512TKN) zum Abbilden eines Bereichs des Mikrochips 90 gesammelt. Die zum Testen der Vorrichtung verwendeten Verbindungen waren Rhodamin B (Exciton Chemical Co., Inc.), Arginin, Glycin, Threonin und o-Phthaldialdehyd (Sigma Chemical Co.). Ein Natriumtetraboratpuffer (20 mM, pH 9,2) mit 2% (v/v) Methanol und 0,5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol war in allen Tests der Puffer. Die Konzentrationen der Aminosäure-, OPA- und Rhodamin B-Lösungen waren 2 mM, 3,7 mM bzw. 50  $\mu$ M. Es wurden verschiedene Betriebsbedingungen verwendet.

Die schematische Darstellung in Figur 23 zeigt ein Beispiel, wenn 1 kV an das gesamte System angelegt ist. Mit dieser Spannungskonfiguration sind die elektrischen Feldstärken in dem Trennkanal 34E ( $E_{sep}$ ) und dem Reaktionskanal 36E ( $E_{rxn}$ ) 200 bzw. 425 V/cm. Dies erlaubt die Kombination von 1 Teil Trennungsausfluß mit 1,125 Teilen Reagens an dem Misch-T 44E. Ein Analyteneinführungssystem wie dieses mit oder ohne der Säule nachgeschalteter Reaktion erlaubt eine sehr schnelle Zykluszeit für viele Analysen.

Die Elektroferogramme (A) und (B) in Figur 24 zeigen die Trennung von zwei Paaren von Aminosäuren. Die Spannungskonfiguration ist die gleiche wie in Figur 23 mit der Ausnahme, daß die gesamte angelegte Spannung 4 kV beträgt, was einer elektrischen Feldstärke von 800 V/cm in der Trennsäule ( $E_{sep}$ ) und 1.700 V/cm in der Reaktionssäule ( $E_{rxn}$ ) entspricht. Die Injektionszeiten betru-

5 gen 100 ms für die Tests, was geschätzten Injektionspfropfenlängen von 384, 245 bzw. 225  $\mu$ m für Arginin, Glycin bzw. Threonin entspricht. Die Injektionsvolumina von 102, 65 bzw. 60 pl entsprechen 200, 130 bzw. 120 injizierten fmol für Arginin, Glycin bzw. Threonin. Der Detektionspunkt liegt 6,5 mm stromabwärts von dem Misch-T, was eine Gesamtsäulenlänge von 13,5 mm für die Trennung und Reaktion ergibt.

10 Die Reaktionsraten der Aminosäuren mit dem OPA sind mäßig schnell, aber nicht schnell genug auf der Zeitskala dieser Experimente. Eine Zunahme der Bandenverzerrung wird beobachtet, weil die Mobilitäten der derivatisierten Verbindungen von den reinen Aminosäuren verschieden sind. Bis die Reaktion vollständig ist, werden sich die Zonen aus nicht umgesetzter und umgesetzter Aminosäure mit verschiedenen Geschwindigkeiten bewegen, was eine Verbreiterung der Analytenzone

15 bewirkt. Wie es in Figur 24 gezeigt wird, weist Glycin die größte Diskrepanz der elektroforetischen Mobilitäten zwischen der derivatisierten und der nicht derivatisierten Aminosäure auf. Um sicherzustellen, daß die übermäßige Bandenverbreiterung nicht eine Funktion der Rückhaltezeit war, wurde Threonin ebenfalls getestet. Threonin hat eine geringfügig längere Rückhaltezeit als das Glycin, jedoch ist die Verbreiterung nicht so stark wie für Glycin.

20 Zum Testen der Effizienz des Mikrochips sowohl in der Trennsäule als auch der Reaktionssäule wurde ein Fluoreszenzlasersfarbstoff, Rhodamin B, als eine Sonde verwendet. Effizienzmessungen, berechnet anhand der Peakbreite bei halber Höhe, wurden unter Anwendung des Punktdetektionssystems bei Abständen von 6 mm und 8 mm von dem Injektionskreuz oder 1 mm stromaufwärts und 1 mm stromabwärts von dem Misch-T durchgeführt. Dies lieferte Information über die Wirkungen des Mischens der zwei Ströme.

25

Die elektrischen Feldstärken in der Reagenziensäule und der Trennsäule waren etwa gleich, und die Feldstärke in der Reaktionssäule betrug das Zweifache derjenigen der Trennsäule. Diese Konfiguration der angelegten Spannungen erlaubte ein Volumenverhältnis von etwa 1:1 von Derivatisierungsreagens und Ausfluß aus der Trennsäule. Mit Zunahme der Feldstärken stieg das Ausmaß an Turbulenz an dem Misch-T. Bei der Trenndistanz von 6 mm (1 mm stromaufwärts von dem Misch-T) war die Bodenhöhe, wie erwartet, das Inverse zu der linearen Geschwindigkeit des Analyten. Bei der Trenndistanz von 8 mm (1 mm stromaufwärts von dem Misch-T) nahmen die Bodenhöhen ab, wie erwartet, als das Inverse der Geschwindigkeit des Analyten. Bei der Trenndistanz von 8 mm (1 mm stromabwärts von dem Misch-T) nahmen die Bodenhöhendaten von 140 V/cm zu 280

30 V/cm zu 1.400 V/cm ab. Dieses Verhalten ist abnormal und zeigt ein Bandenverbreiterungsphänomen, wenn zwei Ströme mit gleichen Volumina zusammenlaufen. Die Geometrie des Misch-T war nicht optimiert, um diese Bandenverzerrung zu minimieren. Über einer Trennfeldstärke von 840 V/cm stabilisiert sich das System und die Bodenhöhe nimmt mit zunehmender linearer Geschwin-

35

digkeit wieder ab. Für  $E_{sep} = 1.400 \text{ V/cm}$  beträgt das Verhältnis der Bodenhöhen bei den Trennlängen von 8 mm und 6 mm 1,22, was kein inakzeptabler Verlust der Effizienz der Trennung ist.

Die Intensität des Fluoreszenzsignals, das aus der Reaktion von OPA mit Aminosäure erzeugt wurde, wurde durch kontinuierliches Pumpen von Glycin entlang des Trennkanals zum Mischen mit dem OPA an dem Misch-T getestet. Das Fluoreszenzsignal aus der OPA/Aminosäure-Reaktion wurde unter Verwendung einer CCD gesammelt, während sich das Produkt stromabwärts von dem Misch-T bewegte. Wieder war das relative Volumenverhältnis des OPA und des Glycinstroms 1,125. OPA hat eine typische Halbwertszeit der Reaktion mit Aminosäuren von 4 Sekunden. Die durchschnittlichen Verweilzeiten eines Analytenmoleküls in dem Beobachtungsfenster sind 4,68, 2,34, 1,17 und 0,58 Sekunden für die elektrischen Feldstärken in der Reaktionssäule ( $E_{rxm}$ ) von 240, 480, 960 bzw. 1.920 V/cm. Die relativen Intensitäten der Fluoreszenz entsprechen qualitativ dieser Halbwertszeit der Reaktion von 4 Sekunden. Wenn die Feldstärke in dem Reaktionskanal ansteigt, verschieben sich die Steigung und das Maximum der Intensität der Fluoreszenz weiter stromabwärts, weil das Glycin und OPA mit höheren Feldstärken schneller aus dem Misch-T weggespült werden. Idealerweise hätte die beobachtete Fluoreszenz aus dem Produkt eine Stufenfunktion einer Antwort nach dem Mischen des Trennungsausflusses und des Derivatisierungsreagenzes. Jedoch verhindern die Kinetik der Reaktion und die letztendliche Mischrate, welche durch Diffusion bestimmt wird, daß dies auftritt.

Die Trennung unter Verwendung des dem Trennkanal nachgeschalteten Reaktors verwendete ein gesteuertes Reaktionssystem gemäß der vorliegenden Erfindung, um die Analyten-, Puffer- und Reagenzienströme isoliert zu halten, wie es oben unter Bezugnahme auf Figur 3 diskutiert ist. Für die dem Trennkanal nachgeschalteten Reaktionen wurde der Mikrochip in einem kontinuierlichen Analytenbeladungs-/trennmodus betrieben, wobei der Analyt kontinuierlich aus dem Analytenreservoir 12E durch die Injektionskreuzung 40E in Richtung des Analytenabfallreservoirs 18E gepumpt wurde. Puffer wurde gleichzeitig aus dem Pufferreservoir 16E in Richtung der Analytenabfall- und Abfallreservoirs 18E, 20E gepumpt, um den Analytenstrom abzulenken und zu verhindern, daß der Analyt den Trennkanal entlang wandert. Zur Injektion eines kleinen aliquoten Teils von Analyt werden die Potentiale an den Puffer- und Analytenabfallreservoirs 16E, 18E einfach für eine kurze Zeitdauer ( $\approx 100 \text{ ms}$ ) erdfrei geschaltet, um zuzulassen, daß der Analyt als ein Analyteninjektionspfropfen entlang des Trennkanals wandert. Zum Abreißen des Injektionspfropfens werden die Potentiale an den Puffer- und Analytenabfallreservoirs 16E, 18E erneut angelegt.

Die Verwendung von mikrotechnisch hergestellten, der Säule nachgeschalteten Reaktoren kann die Wirkung der dem Trennkanal nachgeschalteten Reaktionen als ein analytisches Werkzeug durch Minimieren des Volumens der Plombierung außerhalb des Kanals, insbesondere zwischen den Trenn- und Reagenzienkanälen 34E, 36E, verbessern. Diese Mikrochipausgestaltung (Figur 22) wurde mit geringen Längen für den Trennkanal 34E (7 mm) und den Reagenzienkanal 36E (10,8 mm) hergestellt, was für diese Demonstration mehr als ausreichend war. Längere Trennkanäle können auf einem Mikrochip mit ähnlicher Größe unter Verwendung eines gewundenen Pfades hergestellt werden, um schwierigere Trennungen durchzuführen, wie es oben unter Bezugnahme auf Fi-

gur 12 diskutiert wird. Um die Bandenverzerrungen hinter dem Misch-T zu verringern, sollte das Verhältnis der Kanalabmessungen zwischen dem Trennkanal 34E und dem Reaktionskanal 56 so minimiert werden, daß die elektrische Feldstärke in dem Trennkanal 34E groß ist, d.h. ein enger Kanal, und in dem Reaktionskanal 56 klein ist, d.h. ein breiter Kanal.

- 5 Für Kapillartrennsysteme können die kleinen Detektionsvolumina die Anzahl an Detektionssystemen, die verwendet werden können, um Information herauszuziehen, begrenzen. Fluoreszenzdetektion bleibt eine der empfindlichsten Detektionstechniken für Kapillarelektrophorese. Wenn man Fluoreszenzdetektion in ein System aufnimmt, das keine natürlich fluoreszierenden Analyten aufweist, muß entweder vor oder nach der Trennung eine Derivatisierung des Analyten stattfinden.
- 10 Wenn die fluoreszierende "Markierung" von kurzer Lebensdauer ist oder die Trennung durch der Trennung vorgeschaltete Derivatisierung gestört wird, wird die der Säule nachgeschaltete Zugabe von Derivatisierungsreagens zur Methode der Wahl. Eine Vielzahl von der Trennung nachgeschalteten Reaktoren wurden für Kapillarelektrophorese gezeigt. Jedoch war die Fähigkeit, einen der Trennung nachgeschalteten Reaktor mit Verbindungen für äußerst niedrige Volumina zur Minimierung
- 15 der Bandenverzerrung zu konstruieren, schwierig. Die vorliegende Erfindung wählt den Ansatz der Herstellung einer Mikrochipeinrichtung für elektroforetische Trennungen mit einem integrierten, der Trennung nachgeschalteten Reaktionskanal 56 in einer einzelnen monolithischen Vorrichtung, was äußerst kleine Volumenaustausche zwischen einzelnen Kanalfunktionen ermöglicht.

## 20 Dem Trennkanal vorgeschaltetes Reaktionssystem gemäß der vorliegenden Erfindung

- Anstelle der in Figur 22 gezeigten Ausgestaltung des dem Trennkanal nachgeschalteten Reaktors umfaßt das Mikrochiplaborsystem 10F, das in Figur 25 gezeigt ist, einen dem Trennkanal vorgeschalteten Reaktor. Die in Figur 25 gezeigte Ausgestaltung des dem Trennkanal vorgeschalteten Reaktors ist der in Figur 1 gezeigten ähnlich mit der Ausnahme, daß die ersten und zweiten Kanäle 26F, 28F mit der Reaktionskammer 42F eher eine "Tropfstein"-Gestalt ausbilden als die "Y"-Gestalt aus Figur 1. Die Reaktionskammer 42F wurde so ausgestaltet, daß sie breiter ist als der Trennkanal 34F, um in der Reaktionskammer niedrigere elektrische Feldstärken zu erhalten und somit längere Verweilzeiten für die Reagenzien. Die Reaktionskammer ist 96 µm breit bei halber Höhe und 6,2 µm tief, und der Trennkanal 34F ist 31 µm breit bei halber Höhe und 6,2 µm tief.

- 30 Das Mikrochiplaborsystem 10F wurde verwendet, um dem Trennkanal vorgeschaltete Online-Reaktionen durchzuführen, gekoppelt mit elektroforetischer Analyse der Reaktionsprodukte. Hier wird der Reaktor kontinuierlich mit kleinen aliquoten Teilen betrieben, die periodisch in den Trennkanal 34F unter Verwendung des unter Bezugnahme auf Figur 3 oben diskutierten gesteuerten Verteilers eingebracht werden. Der Betrieb des Mikrochips besteht aus drei Elementen: der Derivatisierung von Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd (OPA), Injektion der Probe auf die Trennsäule und Trennung/Detektion der Bestandteile des Reaktorausflusses. Die für die Experimente verwendeten Verbindungen waren Arginin (0,48 mM), Glycin (0,58 mM) und OPA (5,1 mM; Sigma Chemical Co.).
- 35 Der Puffer in allen drei Reservoirs war 20 mM Natriumtetraborat mit 2% (v/v) Methanol und 0,5%

(v/v) 2-Mercaptoethanol. 2-Mercaptoethanol wird dem Puffer als ein Reduktionsmittel für die Derivatisierungsreaktion zugegeben.

Zum Implementierung der Reaktion wurden die Reservoirs 12F, 14F, 16F, 18F und 20F gleichzeitig mit gesteuerten Spannungen von 0,5 HV, 0,5 HV, HV, 0,2 HV bzw. Erdung versorgt.

5 Diese Konfiguration erlaubte den niedrigsten Potentialabfall über die Reaktionskammer 42F (25 V/cm für an den Mikrochip angelegte 1,0 kV) und den höchsten über den Trennkanal 34F (300 V/cm) für an den Mikrochip angelegte 1,0 kV) ohne signifikantes Auslaufen des Produkts in den Trennkanal, wenn man das gesteuerte Injektionssystem verwendete. Der Spannungsteiler, der verwendet wurde, um die an jedes der Reservoirs angelegten Potentiale aufzubauen, besaß einen Gesamt-  
10 samtwiderstand von 100 M $\Omega$  mit 10 M $\Omega$ -Teilern. Der Analyt aus dem ersten Reservoir 12F und das Reagens aus dem zweiten Reservoir 14F werden elektroosmotisch in die Reaktionskammer 42F mit einem volumetrischen Verhältnis von 1:1,06 gepumpt. Daher sind die Lösungen aus den Analyten- und Reagenzienreservoirs 12F, 14F um einen Faktor von  $\approx 2$  verdünnt. Puffer wurde gleichzeitig durch Elektroosmose aus dem Pufferreservoir 16F in Richtung der Analytenabfall- und  
15 Abfallreservoirs 18F, 20F gepumpt. Dieser Pufferstrom verhindert, daß das neu gebildete Produkt in den Trennkanal 34F ausläuft.

Ein gesteuertes Injektionssystem gemäß der vorliegenden Erfindung, wie es oben unter Bezugnahme auf Figur 3 beschrieben ist, wird verwendet, um Auslauf aus der Reaktionskammer 42F in den Trennkanal 34F zu injizieren. Das Potential an dem Pufferreservoir 16F wird einfach für eine  
20 kurze Zeitdauer (0,1 bis 1,0 Sekunden) erdfrei geschaltet, und Probe wandert in den Trennkanal 34F. Zum Abreißen des Injektionspfropfens wird das Potential an dem Pufferreservoir 16F erneut angelegt. Die Länge des Injektionspfropfens ist eine Funktion sowohl der Zeit der Injektion als auch der elektrischen Feldstärke. Mit dieser Konfiguration des angelegten Potentials erzeugt die Reaktion der Aminosäuren mit dem OPA kontinuierlich frisches Produkt, das zu analysieren ist.

25 Ein wesentlicher Nachteil vieler Kapillarelektrophoreseexperimente war die schlechte Reproduzierbarkeit der Injektionen. Weil das Mikrochipinjektionsverfahren computergesteuert wird und das Injektionsverfahren das Öffnen eines einzelnen Hochspannungsschalters umfaßt, können hierin die Injektionen zeitlich genau gesteuerte Ereignisse sein. Figur 26 zeigt die Reproduzierbarkeit der injizierten Menge (% relative Standardabweichung, % rsd, für die integrierten Bereiche der Peaks) sowohl für Arginin als auch für Glycin bei Injektionsfeldstärken von 0,6 und 1,2 kV/cm und Injektions-  
30 zeiten im Bereich von 0,1 bis 1,0 Sekunden. Für Injektionszeiten von mehr als 0,3 Sekunden liegt die prozentuale relative Standardabweichung unter 1,8%. Dies ist mit beschriebenen Werten für kommerzielle, automatisierte Kapillarelektrophoreseinstrumente vergleichbar. Jedoch haben Injektionen, die auf dem Mikrochip durchgeführt werden,  $\approx 100$ -fach geringeres Volumen, z.B. 100 pl auf dem Mikrochip gegenüber 10 nl auf einem kommerziellen Instrument. Ein Teil dieser Fluktuation ist auf die Stabilität des Lasers zurückzuführen, welche  $\approx 0,6\%$  beträgt. Für Injektionszeiten  $> 0,3$  Sekunden scheint der Fehler unabhängig von der injizierten Verbindung und der Injektionsfeldstärke zu  
35 sein.

Figur 27 zeigt die Überlagerung von drei elektroforetischen Trennungen von Arginin und Glycin nach einer der Säule vorgeschalteten Derivatisierung auf dem Mikrochip mit OPA mit einer Trennfeldstärke von 1,8 kV/cm und einer Trennlänge von 10 mm. Die Trennfeldstärke ist die elektrische Feldstärke in dem Trennkanal 34F während der Trennung. Die Feldstärke in der Reaktionskammer 42F beträgt 150 V/cm. Die Reaktionszeiten für die Analyten stehen in umgekehrtem Verhältnis zu ihren Mobilitäten, z.B. für Arginin beträgt die Reaktionszeit 4,1 Sekunden, und für Glycin beträgt die Reaktionszeit 8,9 Sekunden. Die Volumina der injizierten Pflöpfen waren 150 und 71 pl für Arginin bzw. Glycin, was 35 und 20 fmol der auf den Trennkanal 34F injizierten Aminosäuren entspricht. Der gesteuerte Injektor erlaubt, daß schneller aufeinanderfolgende Injektionen durchgeführt werden. In diesem speziellen Fall könnte alle 4 Sekunden eine Analyse durchgeführt werden. Die beobachteten elektroforetischen Mobilitäten für die Verbindungen werden durch eine lineare Anpassung an die Variation der linearen Geschwindigkeit mit der Trennfeldstärke bestimmt. Die Steigungen waren 29,1 und 13,3 mm<sup>2</sup>/(kV·s) für Arginin bzw. Glycin. Es wurde kein Hinweis auf Stromwärme beobachtet, wie es durch die Linearität der Geschwindigkeit gegenüber der Feldstärkedaten angedeutet wird. Eine lineare Anpassung produzierte Korrelationskoeffizienten von 0,999 für Arginin und 0,996 für Glycin für Trennfeldstärken von 0,2 bis 2,0 kV/cm.

Mit steigenden Potentialen, die an das Mikrochiplaborsystem 10F angelegt werden, steigen die Feldstärken in der Reaktionskammer 42F und dem Trennkanal 34F. Dies führt zu kürzeren Verweilzeiten der Reaktanten in der Reaktionskammer und schnelleren Analysezeiten für die Produkte. Durch Variieren der an den Mikrochip angelegten Potentiale können die Reaktionskinetiken studiert werden. Die Veränderung der erzeugten Produktmenge mit der Reaktionszeit ist in Figur 28 aufgetragen. Die Antwort ist die integrierte Fläche des Peaks, korrigiert hinsichtlich der Verweilzeit in dem Detektorbeobachtungsfenster und der Photobleichung des Produkts. Der Versatz zwischen den Daten für das Arginin und das Glycin in Figur 28 ist in erster Linie auf den Unterschied in den injizierten Mengen zurückzuführen, d.h. verschiedene elektroforetische Mobilitäten für die Aminosäuren. Es wurde ein zehnfacher Überschuß an OPA verwendet, um Reaktionsbedingungen von pseudo-erster Ordnung zu erhalten. Die Steigungen der an die Daten angepaßten Geraden entsprechen den Raten der Derivatisierungsreaktion. Die Steigungen sind 0,13 s<sup>-1</sup> für Arginin und 0,11 s<sup>-1</sup> für Glycin, was Halbwertszeiten der Reaktion von 5,1 bzw. 6,2 Sekunden entspricht. Diese Halbwertszeiten der Reaktion sind vergleichbar mit den zuvor für Alanin beschriebenen 4 Sekunden. Wir haben keine zuvor beschriebenen Daten für Arginin oder Glycin gefunden.

Diese Ergebnisse zeigen den potentiellen Nutzen integrierter mikrotechnisch hergestellter Systeme zur Durchführung chemischer Verfahren. Die in Figur 28 präsentierten Daten können unter Computersteuerung innerhalb von etwa 5 Minuten produziert werden, wobei größenordnungsmäßig 100 nl Reagens verbraucht werden. Diese Ergebnisse sind beispiellos hinsichtlich Automatisierung, Geschwindigkeit und Volumen für chemische Reaktionen.

### DNA-Analyse

Zur Demonstration eines nützlichen biologischen Analyseverfahrens werden ein Restriktionsverdau und ein elektroforetisches Größenbestimmungsexperiment nacheinander auf dem in Figur 30 gezeigten integrierten biochemischen Reaktor/Elektroforese-Mikrochipssystem 10G durchgeführt. Das Mikrochiplaborsystem 10G ist zu dem in Figur 30 gezeigten Laborsystem (welches gemäß der vorliegenden Erfindung ist) identisch mit der Ausnahme, daß der Trennkanal 34G des Laborsystems 10G einem gewundenen Weg folgt. Die Sequenz für das Plasmid pBR322 und die Erkennungssequenz des Enzyms Hinf I sind bekannt. Nach einem Verdau wird eine Bestimmung der Fragmentverteilung durchgeführt, indem die Verdauprodukte unter Verwendung von Elektroforese in einem Siebmedium in dem Trennkanal 34G getrennt werden. Für diese Experimente wird Hydroxyethylzellulose als das Siebmedium verwendet. An einem festen Punkt stromabwärts in dem Trennkanal 34G werden wandernde Fragmente unter induzierter Fluoreszenz mittels eines Lasers auf dem Chip mit einem interkalierenden Farbstoff, Thiazolorangedimer (TOTO-1), als das Fluorophor abgefragt.

Die Reaktionskammer 42G und der Trennkanal 34G, die in Figur 29 gezeigt sind, sind 1 bzw. 67 mm lang, haben eine Breite bei halber Höhe von 60 µm und eine Tiefe von 12 µm. Darüber hinaus sind die Kanalwände mit Polyacrylamid beschichtet, um elektroosmotischen Fluß und Adsorption zu minimieren. Elektroferogramme werden unter Verwendung von Einzelpunktdetektion mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion erzeugt. Ein Argonionenlaser (10 mW) wird auf einen Punkt auf dem Chip unter Verwendung einer Linse (100 mm Brennweite) fokussiert. Das Fluoreszenzsignal wird unter Verwendung einer 21x Objektivlinse (N.A. = 0,42) gesammelt, gefolgt von räumlichem Filtern (0,6 mm Blendendurchmesser) und Spektralfiltern (560 nm Bandpaß, 40 nm Bandbreite) und Messen unter Verwendung eines Photomultiplerröhrchens (PMT). Die Datenerfassungs- und Spannungsschalteneinrichtung sind computergesteuert. Der Reaktionspuffer enthält 10 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat und 50 mM Kaliumacetat. Der Reaktionspuffer wird in die in Figur 29 gezeigten DNA-, Enzym- und Abfall-1-Reservoirs 12G, 14G und 18G gegeben. Der Trennpuffer enthält 9 mM Tris-Borat mit 0,2 mM EDTA und 1% (w/v) Hydroxyethylzellulose. Der Trennpuffer wird in die Puffer- und Abfall-2-Reservoirs 16F und 20F gegeben. Die Konzentrationen des Plasmids pBR322 und des Enzyms Hinf I betragen 125 ng/µl bzw. 4 Einheiten/µl. Die Verdau und Trennungen werden bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt.

Die DNA und das Enzym werden elektroforetisch in die Reaktionskammer 42G aus ihren entsprechenden Reservoirs 12G, 14G durch Anlegen eines geeigneten elektrischen Potentials geladen. Die relativen Potentiale an den DNA- (12G), Enzym- (14G), Puffer- (16G), Abfall-1- (18G) und Abfall-2- (20G) Reservoirs betragen 10%, 10%, 0, 30% bzw. 100%. Aufgrund der Unterschiede der elektroforetischen Mobilität zwischen der DNA und dem Enzym wird die Beladungsdauer ausreichend lang ausgestaltet, um ein Gleichgewicht zu erreichen. Aufgrund des kleinen Volumens der Reaktionskammer 42G, 0,7 nl, findet auch ein schnelles Diffusionsmischen statt. Der elektroosmotische Fluß wird durch die kovalente Immobilisierung von linearem Polyacrylamid minimiert, so daß nur Anionen aus den DNA- und Enzymreservoirs 12G, 14G in die Reaktionskammer 42G bei den

verwendeten Potentialverteilungen wandern. Der Reaktionspuffer, welcher Kationen enthält, die für die enzymatischen Verdaus erforderlich sind, z.B.  $Mg^{2+}$ , wird ebenfalls in dem Abfall-1-Reservoir 18G untergebracht. Dies ermöglicht, daß sich die Kationen in die Reaktionskammer im Gegenstrom zu der DNA und dem Enzym während des Beladens der Reaktionskammer ausbreiten. Der Verdau wird wegen der relativ kurzen Durchtrittszeit der DNA durch die Reaktionskammer statisch durchgeführt, indem nach dem Beladen der Reaktionskammer 42G alle elektrischen Potentiale entfernt werden.

Nach der Dauer des Verdaus wandern die Produkte in den Trennkanal 34F zur Analyse durch Anheben der Spannungen an den Puffer- und Abfall-1-Reservoirs 16F, 18F. Die Injektion besitzt eine Mobilitätsvorspannung, wo die kleineren Fragmente bevorzugt gegenüber den größeren Fragmenten injiziert werden. In diesen Experimenten wird geschätzt, daß die Injektionspfropfenlänge für das 75 Basenpaare (bp) lange Fragment 0,34 mm beträgt, wogegen es für das 1632 bp Fragment nur 0,22 mm sind. Diese Pfropfenlängen entsprechen 34% bzw. 22% des Reaktionskammervolumens. Die gesamten Inhalte der Reaktionskammer 42F können unter derzeitigen Trennbedingungen nicht analysiert werden, weil der Beitrag der Injektionspfropfenlänge zu der Bodenhöhe überwältigend wäre.

Nach Verdau und Injektion auf den Trennkanal 34F werden die Fragmente unter Verwendung von 1,0% (w/v) Hydroxyethylzellulose als Siebmedium aufgelöst. Figur 29 zeigt ein Elektropherogramm der Restriktionsfragmente des Plasmides pBR322 nach einem zweiminütigen Verdau mit dem Enzym Hinf I. Um eine effiziente Färbung der doppelsträngigen DNA auf der Säule nach dem Verdau, aber vor dem Abfragen zu ermöglichen, wird der interkalierende Farbstoff TOTO-I (1  $\mu M$ ) nur in das Abfall-2-Reservoir 20G gegeben und wandert im Gegenstrom zu der DNA. Wie erwartet steigt die relative Intensität der Banden mit zunehmender Fragmentgröße an, weil in den größeren Fragmenten mehr Interkalationsstellen vorhanden sind. Die nicht aufgelösten 220/221 und 507/511 bp Fragmente haben aufgrund der Bandenüberlappung höhere Intensitäten als benachbarte Einzelfragmentpeaks. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und Injektionsvolumina beträgt 0,55 bzw. 3,1% relative Standardabweichung (% *rsd*) für fünf wiederholte Analysen.

Diese Demonstration eines Mikrochiplaborsystems 10G, das Plasmid-DNA-Restriktionsfragmentanalyse leistet, zeigt die Möglichkeit der Automatisierung und Miniaturisierung anspruchsvollerer biochemischer Verfahren. Dieses Experiment repräsentiert die anspruchsvollste integrierte Mikrochipeinrichtung für chemische Analyse, die bis heute gezeigt wurde. Die Vorrichtung mischt ein Reagens mit einem Analyten, inkubiert das Analyt/Reagens-Gemisch, markiert die Produkte und analysiert die gesamten Produkte unter Computersteuerung, während es 10.000-mal weniger Material verbraucht als das typische Laborverfahren mit kleinem Volumen.

Allgemein kann die vorliegende Erfindung dazu verwendet werden, verschiedene Fluide, die in verschiedenen Anschlüssen oder Reservoirs enthalten sind, zu mischen. Dies könnte für ein Flüssigchromatographietrennexperiment verwendet werden, gefolgt von der Säule nachgeschalteten Markierungsreaktionen, in denen verschiedene chemische Lösungen mit einem gegebenen Volumen in den primären Trennkanal gepumpt werden, und andere Reagenzien oder Lösungen können





zu verschiedenen Zeiten in den Strom injiziert oder gepumpt werden, um in präzisen und bekannten Konzentrationen gemischt zu werden. Zur Ausführung dieses Verfahrens ist es notwendig, Lösungen in den verschiedenen Kanälen genau zu steuern und zu manipulieren.

##### 5 Einer Trennung vor-/nachgeschaltetes Reaktorsystem

Figur 31 zeigt das gleiche Mikrochiplaborsystem 10 mit sechs Anschlüssen, das in Figur 1 gezeigt ist, welches den Vorteil dieses Mischsystems nutzen könnte. Besondere Merkmale sind an den verschiedenen Anschlüssen befestigte Lösungsmittelreservoirs. Dieses Laborsystem könnte potentiell für ein Flüssigchromatographietrennungsexperiment, gefolgt von der Säule nachgeschalteten Markierungsreaktionen verwendet werden. In solch einem Experiment würden Reservoirs 12 und 14 Lösungsmittel enthalten, die in einem Flüssigchromatographielösungsmittelprogrammtyp der Trennung verwendet würden, z.B. Wasser und Acetonitril.

Der Kanal 34, der mit dem Abfallreservoir 20 und mit den zwei Kanälen 26 und 28, welche die Analyten- und Lösungsmittelreservoirs 12 und 14 verbinden, verbunden ist, ist der primäre Trennkanal, d.h. wo das Flüssigchromatographieexperiment stattfinden würde. Die sich kreuzenden Kanäle 30, 32, welche die Puffer- und Analytenabfallreservoirs 16 und 18 verbinden, werden dazu verwendet, eine Injektion in den Flüssigchromatographie- oder Trennkanal 34 durchzuführen, wie es oben diskutiert wird. Schließlich werden das Reservoir 22 und dessen Kanal 36, die mit dem Trennkanal 34 verbunden sind, dazu verwendet, Reagens hinzuzufügen, welches in Anteilen zugegeben wird, um die in dem Trennkanal getrennten Spezies detektierbar zu machen.

Zur Durchführung dieses Verfahrens ist es notwendig, Lösungen in den verschiedenen Kanälen genau zu steuern und zu manipulieren. Die oben beschriebenen Ausführungsformen verwendeten sehr kleine Volumina an Lösung ( $\approx 100$  pl) aus den Reservoirs 12 und 14 und injizierten sie genau in den Trennkanal 34. Für diese verschiedenen Szenarien muß ein vorgegebenes Volumen an Lösung von einem Kanal in einen anderen überführt werden. Zum Beispiel erfordert Lösungsmittelprogrammierung für Flüssigchromatographie oder Reagenzienzugabe für der Säule nachgeschaltete Markierungsreaktionen, daß Lösungsströme in präzisen und bekannten Konzentrationen gemischt werden.

Das Mischen verschiedener Lösungsmittel in bekannten Verhältnissen kann durch Steuerung von Potentialen, welche letztendlich die elektroosmotischen Flüsse steuern, wie es in Gleichung 1 angegeben ist, durchgeführt werden. Gemäß Gleichung 1 muß die elektrische Feldstärke bekannt sein, um die lineare Geschwindigkeit des Lösungsmittels zu bestimmen. Allgemein wird bei diesen Arten von Fluidmanipulationen ein bekanntes Potential oder eine bekannte Spannung an ein vorgegebenes Reservoir angelegt. Die Feldstärke kann aus der angelegten Spannung und den Merkmalen des Kanals berechnet werden. Darüber hinaus muß der Widerstand oder die Leitfähigkeit des Fluides in den Kanälen ebenfalls bekannt sein.

Der Widerstand eines Kanals ist durch Gleichung 2 gegeben, worin  $R$  der Widerstand,  $\kappa$  der spezifische Widerstand,  $L$  die Länge des Kanals und  $A$  die Querschnittsfläche ist.

$$R_{i=\frac{\rho_i L_i}{A_i}} \quad (2)$$

Fluide werden üblicherweise durch die Leitfähigkeit charakterisiert, welche nur der reziproke Wert des Widerstands ist, wie es in Gleichung 3 gezeigt ist. In Gleichung 3 ist K die elektrische Leitfähigkeit,  $\rho$  ist die spezifische Leitfähigkeit, A ist die Querschnittsfläche, und L ist die Länge, wie oben.

$$K_{i=\frac{\kappa_i}{L_i}} \quad (3)$$

Unter Anwendung des Ohmschen Gesetzes und der Gleichungen 2 und 3 können wir die Feldstärke in einem bestimmten Kanal i als den Spannungsabfall über den Kanal, geteilt durch dessen Länge, angeben, welche gleich dem Strom  $I_i$  durch Kanal i, multipliziert mit dem spezifischen Widerstand dieses Kanals, geteilt durch die Querschnittsfläche, ist, wie es in Gleichung 4 gezeigt ist.

$$E_{i=\frac{V_i}{L_i}=\frac{I_i P_i}{A_i}=\frac{I_i}{\kappa_i A_i}} \quad (4)$$

Daher kann, wenn der Kanal sowohl bezüglich der Abmessungen als auch elektrisch charakterisiert ist, der Spannungsabfall über den Kanal oder der Strom durch den Kanal dazu verwendet werden, die Lösungsmittelgeschwindigkeit oder die Flußrate durch den Kanal zu bestimmen, wie es in Gleichung 5 ausgedrückt ist. Es ist auch festzuhalten, daß der Fluidfluß von dem Zeta-Potential der Oberfläche und somit von dem chemischen Aufbau des Fluides und der Oberfläche abhängt.

$$V_i \sim I_i \sim \text{Fluß}$$

Offensichtlich hängen die spezifische Leitfähigkeit  $\kappa$  oder der spezifische Widerstand  $\rho$  von den Eigenschaften der Lösung ab, die von Kanal zu Kanal variieren könnten. In vielen CE-Anwendungen dominieren die Eigenschaften des Puffers die elektrischen Eigenschaften des Fluides, und daher ist die Leitfähigkeit konstant. Im Falle von Flüssigchromatographie, wo Lösungsmitteiprogrammierung durchgeführt wird, könnten die elektrischen Eigenschaften der zwei mobilen Phasen erheblich voneinander abweichen, wenn kein Puffer verwendet wird. Während eines Lösungsmitteiprogrammierungslaufs, bei dem sich der Molanteil des Gemisches ändert, kann sich die spezifische Leitfähigkeit des Gemisches in einer nichtlinearen Art und Weise ändern, jedoch wird sie sich von der spezifischen Leitfähigkeit des einen reinen Lösungsmittels zu dem anderen monoton ändern. Die tatsächliche Veränderung der Leitfähigkeit mit dem Molanteil hängt zusätzlich zu der

spezifischen Leitfähigkeit der einzelnen Ionen von der Dissoziationskonstante des Lösungsmittels ab.

Wie es oben beschrieben ist, könnte die schematisch in Figur 31 gezeigte Vorrichtung z.B. zur Durchführung von Gradientenelutionsflüssigchromatographie mit der Säule nachgeschalteter Markierung zu Detektionszwecken verwendet werden. Die Figuren 31(a), 31(b) und 31(c) zeigen die Fluidflußerfordernisse für eine Ausführung der in einem Flüssigchromatographieexperiment, wie es oben erwähnt ist, involvierten Aufgaben. Die Pfeile in den Figuren zeigen die Richtung und die relative Größe der Strömung in den Kanälen. In Figur 31(a) wird ein Volumen des Analyten aus dem Analytenreservoir 16 in die Trennkreuzung 40 geladen. Zur Durchführung einer gedrängten Injektion ist es notwendig, die Probe von dem Analytenreservoir 16 über die Kreuzung zu dem Analytenabfallreservoir 18 zu transportieren. Um das Analytenvolumen zu begrenzen, muß zusätzlich Material von dem Trennkanal 34 und den Lösungsmittelreservoirs 12, 14 in Richtung der Kreuzung 40 fließen, wie es gezeigt ist. Der Fluß von dem ersten Reservoir 12 ist viel größer als derjenige von dem zweiten Reservoir 14, weil dies die anfänglichen Bedingungen für ein Gradientenelutionsexperiment sind. Am Anfang des Gradientenelutionsexperimentes ist es erwünscht zu verhindern, daß das Reagens in dem Reagenzienreservoir 22 in den Trennkanal 34 eintritt. Um solch einen Reagenzienfluß zu verhindern, ist ein geringer Fluß an Puffer aus dem Abfallreservoir 20, der in Richtung des Reagenzienkanals 36 gerichtet ist, erwünscht, und dieser Fluß sollte so nahe bei 0 liegen wie möglich. Nachdem ein repräsentatives Analytvolumen an der Injektionskreuzung 40 präsentiert wurde, kann die Trennung fortgeführt werden.

In Figur 31(b) ist der Betriebs- (Trenn-) Modus gezeigt, bei dem Lösungsmittel aus den Reservoirs 12 und 14 durch die Kreuzung 40 und entlang des Trennkanals 34 fließen. Zusätzlich fließen die Lösungsmittel in Richtung der Reservoirs 4 und 5, um eine saubere Injektion des Analyten in den Trennkanal 34 durchzuführen. Ein geeigneter Fluß von Reagens aus dem Reagenzienreservoir 22 wird ebenfalls in Richtung des Trennkanals gerichtet. Die Anfangsbedingung, wie sie in Figur 31(b) gezeigt ist, ist mit einem großen Molanteil an Lösungsmittel 1 und einem kleinen Molanteil an Lösungsmittel 2. Die an die Lösungsmittelreservoirs 12, 14 angelegten Spannungen werden als eine Funktion der Zeit verändert, so daß die Anteile an Lösungsmitteln 1 und 2 von einem Überschuß an Lösungsmittel 1 nach hauptsächlich Lösungsmittel 2 verändert werden. Dies ist in Figur 31(c) gezeigt. Diese letztgenannte monotone Veränderung der angelegten Spannung bewirkt das Gradientenelutionsflüssigchromatographieexperiment. Wenn die isolierten Bestandteile den Reagenzienzugabekanal 36 passieren, kann eine geeignete Reaktion zwischen diesem Reagens und dem isolierten Material unter Bildung einer detektierbaren Spezies stattfinden.

Figur 32 zeigt, wie die Spannungen an den verschiedenen Reservoirs für ein hypothetisches Gradientenelutionsexperiment verändert werden. Die in diesem Diagramm gezeigten Spannungen geben nur relative Höhen und nicht absolute Spannungen an. In dem Beladungsmodus des Vorgangs werden statische Spannungen an die verschiedenen Reservoirs angelegt. Lösungsmittelfluß aus allen Reservoirs, ausgenommen dem Reagenzienreservoir 22, findet in Richtung des Analytenabfallreservoirs 18 statt. Daher hat das Analytenreservoir 18 das niedrigste Potential, und alle an-

deren Reservoirs haben ein höheres Potential. Das Potential des Reagenzienreservoirs sollte ausreichend unterhalb desjenigen des Abfallreservoirs 20 liegen, um nur einen geringfügigen Fluß in Richtung des Reagenzienreservoirs zu liefern. Die Spannung an dem zweiten Lösungsmittelreservoir 14 sollte ausreichend groß bezüglich der Höhe sein, um einen Nettofluß in Richtung der Injektionskreuzung 40 zu liefern, aber der Fluß sollte eine geringe Größe haben.

Beim Bewegen in den Betriebs- (Start-) Modus, wie er in Figur 31(b) gezeigt ist, werden die Potentiale erneut eingestellt, wie es in Figur 32 gezeigt ist. Der Fluß ist nun so, daß sich das Lösungsmittel aus den Lösungsmittelreservoirs 12 und 14 entlang des Trennkanals 34 in Richtung des Abfallreservoirs 20 bewegt. Es findet auch ein geringfügiger Lösungsmittelfluß weg von der Injektionskreuzung 40 in Richtung der Analyten- und Analytenabfallreservoirs 16 und 18 und ein geeigneter Reagenzienfluß aus dem Reagenzienreservoir 22 in den Trennkanal 34 statt. Das Abfallreservoir 20 muß sich nun bei dem minimalen Potential und das erste Lösungsmittelreservoir 12 bei dem höchsten Potential befinden. Alle anderen Potentiale werden so eingestellt, daß die Fluidflußrichtungen und -größen geliefert werden, wie sie in Figur 31(b) gezeigt sind. Wie es in Figur 32 gezeigt ist, werden auch die an die Lösungsmittelreservoirs 12 und 14 angelegten Spannungen monoton so verändert, daß sie sich von den Bedingungen eines großen Molanteils an Lösungsmittel 1 zu einem großen Molanteil an Lösungsmittel 2 verändern.

Am Ende des Lösungsmittelprogrammierungslaufes ist die Vorrichtung nun bereit für ein Zurückschalten in den Injektionszustand zum Beladen einer weiteren Probe. Die Spannungsveränderungen, wie sie in Figur 32 gezeigt sind, sollten nur erläutern, was getan werden könnte, um die verschiedenen Fluidflüsse in den Figuren 31(a)-(c) zu liefern. In einem tatsächlichen Experiment können einige der verschiedenen Spannungen in ihrer relativen Höhe stark abweichen.

Obwohl vorteilhafte Ausführungsformen zur Erläuterung der Erfindung ausgewählt wurden, ist für den Fachmann auf dem Gebiet klar, daß verschiedene Veränderungen und Modifikationen daran vorgenommen werden können, ohne vom Schutzzumfang der Erfindung abzuweichen, wie er in den anhängenden Patentansprüchen definiert ist.

95 927 492.9 - 0 755 306  
UT-Battelle, LLC

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Verteilen von Fluidproben aus einem Fluidmaterial in einem Mikrochiplabor-  
system, wobei das System (10A) einen Aufbau mit integrierten Kanälen (24A) in einer Flüssigkeits-  
verbindung mit wenigstens vier Reservoirs (12A, 16A, 18A, 20A) zur Aufnahme des Fluidmaterials  
10 und ein System zum Anlegen eines elektrischen Potentials an die wenigstens vier Reservoirs auf-  
weist, wobei die Kanäle eine Kreuzung (40A) definieren aus: (a) einem ersten Kanal (26A), über den  
ein erstes Vorratsreservoir (12A) in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung (40A) ist, einem zwei-  
ten Kanal (32A), über den die Kreuzung in Flüssigkeitsverbindung mit einem ersten Abfallreservoir  
15 (18A) ist, (b) einem dritten Kanal (30A), über den ein zweites Vorratsreservoir (16A) in Flüssigkeits-  
verbindung mit der Kreuzung ist, und (c) einem Trennkanal (34A), über den die Kreuzung in Flüssig-  
keitsverbindung mit einem zweiten Abfallreservoir (20A) ist, wobei das Verfahren die Stufen umfaßt,  
in denen man:

(A) Potentiale an die ersten (16A) und zweiten (12A) Vorratsreservoirs und an die ersten  
20 (18A) und zweiten (20A) Abfallreservoirs in der Weise anlegt, daß Material von dem  
zweiten Vorratsreservoir (16A) zu den ersten und zweiten Abfallreservoirs und Mate-  
rial von dem ersten Vorratsreservoir (12A) zu dem ersten Abfallreservoir (18A)  
strömt, so daß Material von dem ersten Vorratsreservoir (12A) zu der Kreuzung  
geliefert wird,

(B) Potentiale an wenigstens das erste Vorratsreservoir (12A) und das zweite Abfallre-  
servoir (20A) anlegt, so daß die Umleitung einer Probe aus Material, das aus dem  
ersten Vorratsreservoir (12A) stammt, von der Kreuzung zu dem Trennkanal (34A)  
beginnt, und

(C) die Potentiale aus Stufe (A) erneut anlegt, um die Umleitung zu beenden und die  
Probe durch den Trennkanal zu bewegen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Stufe (A) das Anlegen eines ersten Potentials an das  
35 zweite Vorratsreservoir (16A), niedrigerer Potentiale an das erste Vorratsreservoir (12A) und das  
erste Abfallreservoir (18A) und eines noch niedrigeren Potentials an das zweite Abfallreservoir (20A)  
umfaßt, so daß Material von dem zweiten Vorratsreservoir (16A) zu den ersten und zweiten Abfall-  
reservoirs (18A, 20A) strömt und Material von dem ersten Vorratsreservoir (12A) zu dem ersten Ab-  
fallreservoir (18A) strömt, so daß Material von dem ersten Vorratsreservoir (12A) zu der Kreuzung  
40 (40A) geliefert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei Stufe (B) das Anlegen eines Potentials an das erste Vorratsreservoir (12A) umfaßt, welches gegenüber dem an das zweite Abfallreservoir (20A) angelegte Potential hoch ist, so daß die Umleitung der Probe von Material, welches aus dem ersten Vorratsreservoir (12A) stammt, von der Kreuzung (40A) zu dem Trennkanal (34A) beginnt, wobei die an die anderen Reservoirs angelegten Potentiale nicht höher sind als dasjenige, welches an das erste Vorratsreservoir (12A) angelegt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, durchgeführt in einem System (10E), welches ein weiteres Vorratsreservoir (22E) in Flüssigkeitsverbindung mit dem Trennkanal (34E) aufweist, und welches die weiteren Stufen umfaßt, bei denen man D) den Trennkanal dazu verwendet, die Probe zu analysieren, und E) ein Potential an das weitere Reservoir (22E) anlegt, um zu bewirken, daß wenigstens ein Teil der analysierten Probe in dem Trennkanal (34E) mit einem in dem weiteren Reservoir (22E) aufbewahrten Reaktanden reagiert.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3 in einem System (10F) mit einem weiteren Vorratsreservoir (14F) in einer Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung (40F), wobei das weitere und das erste Vorratsreservoir (14F, 12F) Reagenzien speichern, und mit den Stufen, in denen man die Reagenzien in dem System stromaufwärts der Kreuzung (40F) in einer Reaktionskammer (42F) zwischen der Kreuzung und dem ersten (12F) und dem weiteren (14F) Vorratsreservoir umsetzt,

(A) Potentiale an das zweite (16F), das weitere (14F) und das erste (12F) Vorratsreservoir und an die ersten (18F) und zweiten (20F) Abfallreservoirs anlegt, so daß Material von dem zweiten Vorratsreservoir (16F) zu den ersten (18) und zweiten (20) Abfallreservoirs strömt und Reagenzien von dem ersten (12F) und dem weiteren (14F) Vorratsreservoir zu dem ersten Abfallreservoir (18F) strömen, um Reaktant an die Kreuzung (40F) zu liefern,

(B) Potentiale an das erste und das weitere Vorratsreservoir (12F, 14F) und an das erste Abfallreservoir (18) und an die anderen Reservoirs anlegt, so daß die Umleitung einer Reaktantenprobe von der Kreuzung zu dem Trennkanal (34F) beginnt, und

(C) die Potentiale aus Stufe (A) erneut anlegt, um die Umleitung zu beenden und die Probe durch den Trennkanal (34F) zu bewegen.

6. Mikrochiplaborsystem, wobei das System (10A) einen Aufbau mit integrierten Kanälen (24A) in einer Flüssigkeitsverbindung mit wenigstens vier Reservoirs (12A, 16A, 18A, 20A) zur Aufnahme von Fluidmaterial und ein System zum Anlegen von elektrischen Potentialen an die wenigstens vier Reservoirs umfaßt, wobei die Kanäle eine Kreuzung (40A) definieren aus: (a) einem ersten Kanal

- (26A), über den ein erstes Vorratsreservoir (12A) in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung ist, einem zweiten Kanal (32A), über den die Kreuzung in Flüssigkeitsverbindung mit einem ersten Abfallreservoir (18A) ist, (b) einem dritten Kanal (30A), über den ein zweites Vorratsreservoir (16A) in Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung (40A) ist, und (c) einem Trennkanal (34A), über den die
- 5 Kreuzung in einer Flüssigkeitsverbindung mit einem zweiten Abfallreservoir (20A) ist, wobei das System zum Anlegen elektrischer Potentiale so ausgelegt ist, daß es nach dem Verfahren der Ansprüche 1, 2 oder 3 arbeitet.
7. System nach Anspruch 6, welches ein weiteres Reservoir (22E) in Flüssigkeitsverbindung
- 10 mit dem Trennkanal (34E) aufweist, wobei das System zum Anlegen elektrischer Potentiale so ausgelegt ist, daß es gemäß Anspruch 4 arbeitet.
8. System nach Anspruch 6, welches ein weiteres Reservoir (14F) und eine Reaktionskammer (42F) zwischen der Kreuzung und dem ersten (12F) und dem weiteren (14F) Vorratsreservoir in
- 15 einer Flüssigkeitsverbindung mit der Kreuzung aufweist, wobei das System zum Anlegen elektrischer Potentiale so ausgelegt ist, daß es gemäß Anspruch 5 arbeitet.

FIG. 1

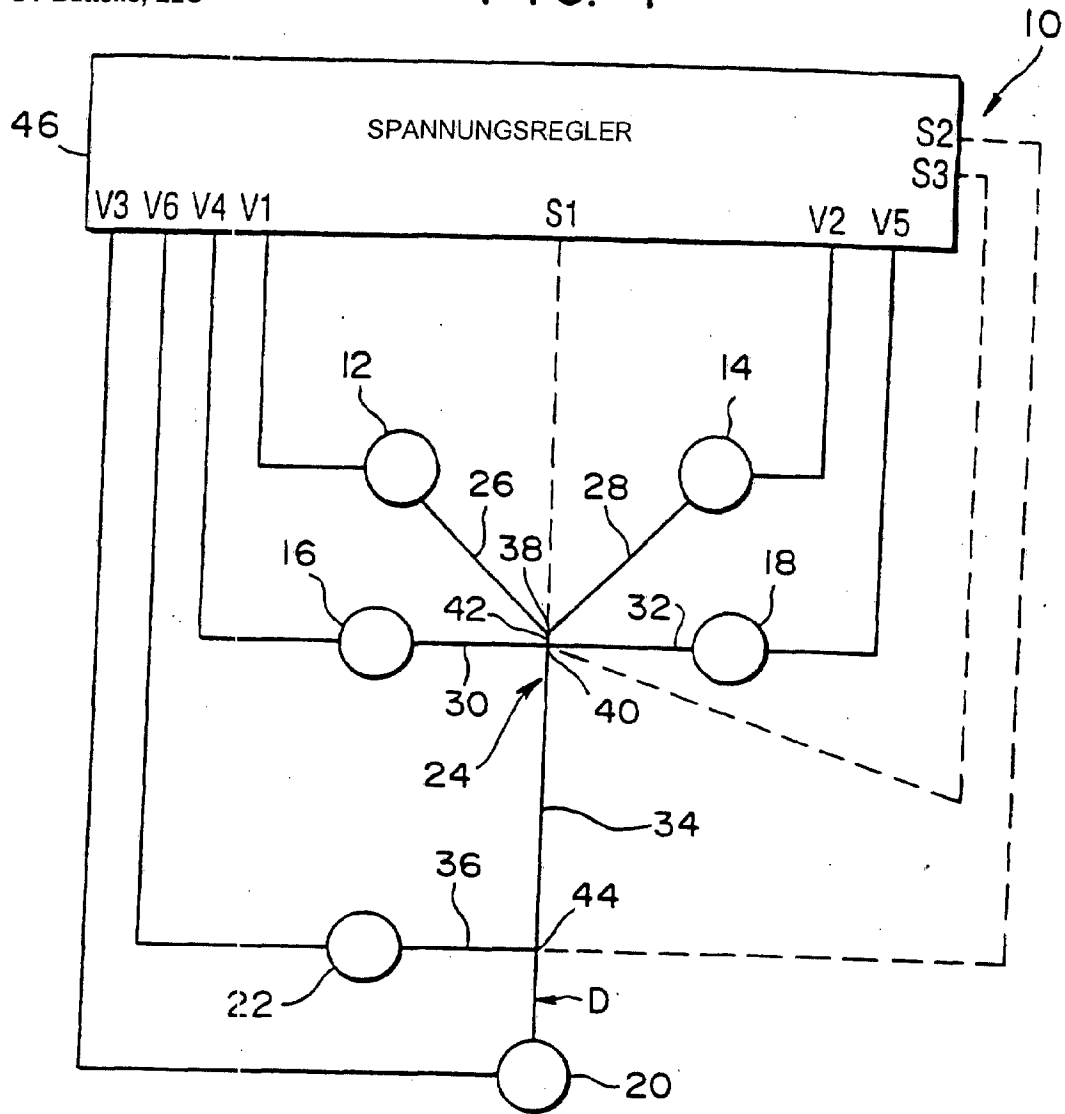


FIG. 2

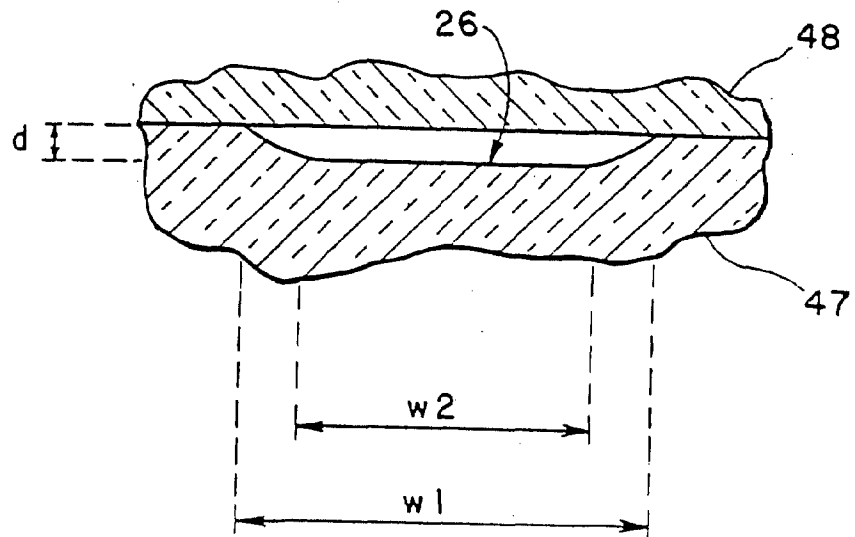




FIG. 3

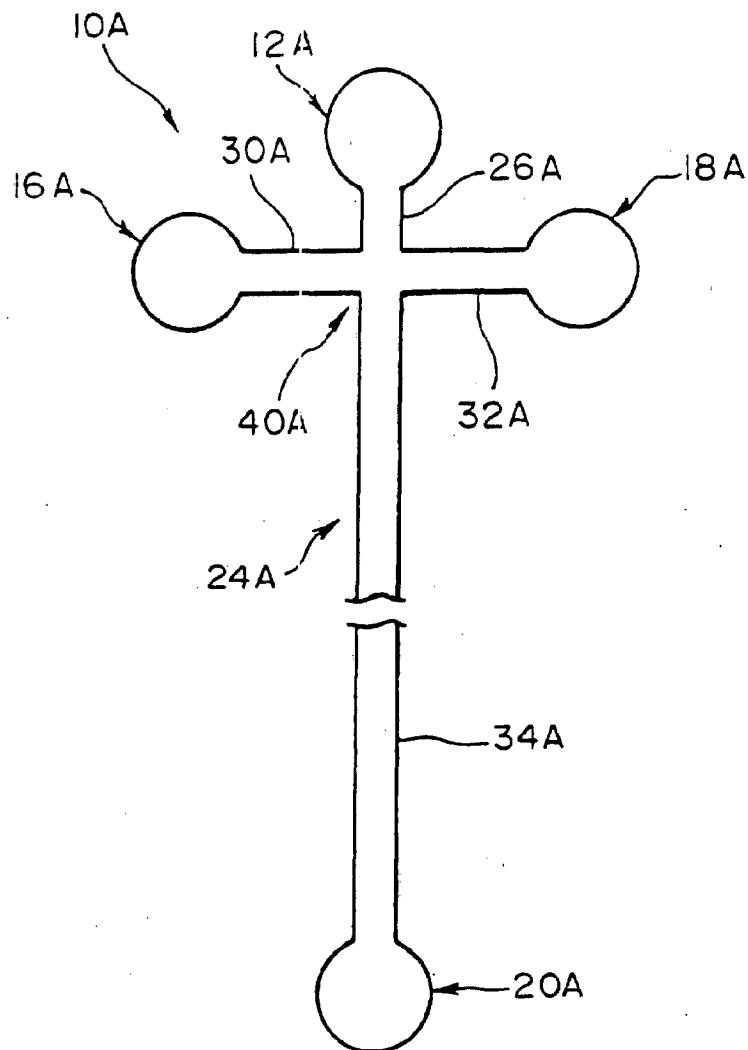


FIG. 4

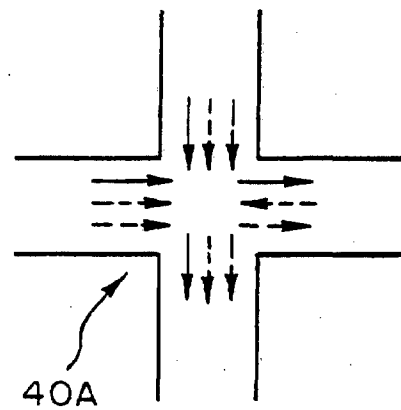


FIG. 5(a) FIG. 5(b) FIG. 5(c)

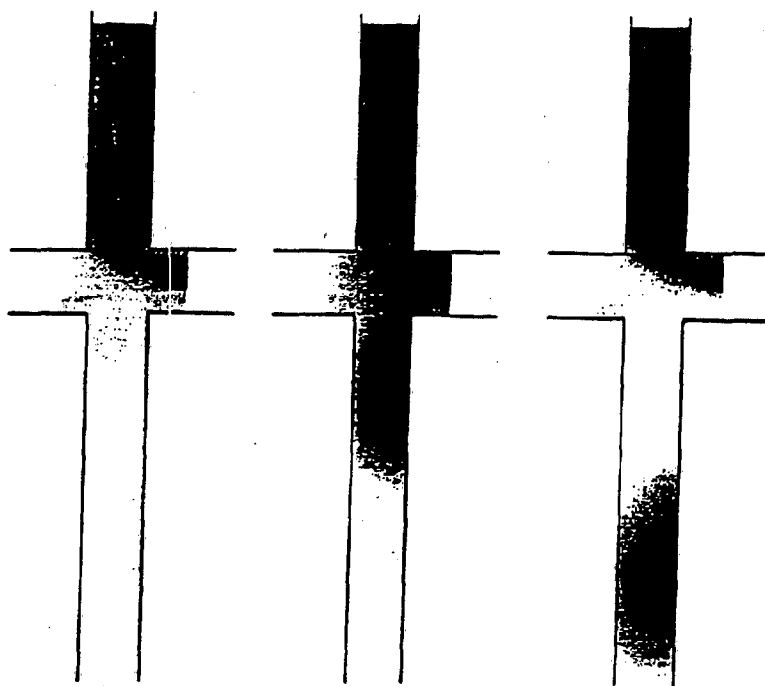


FIG. 7

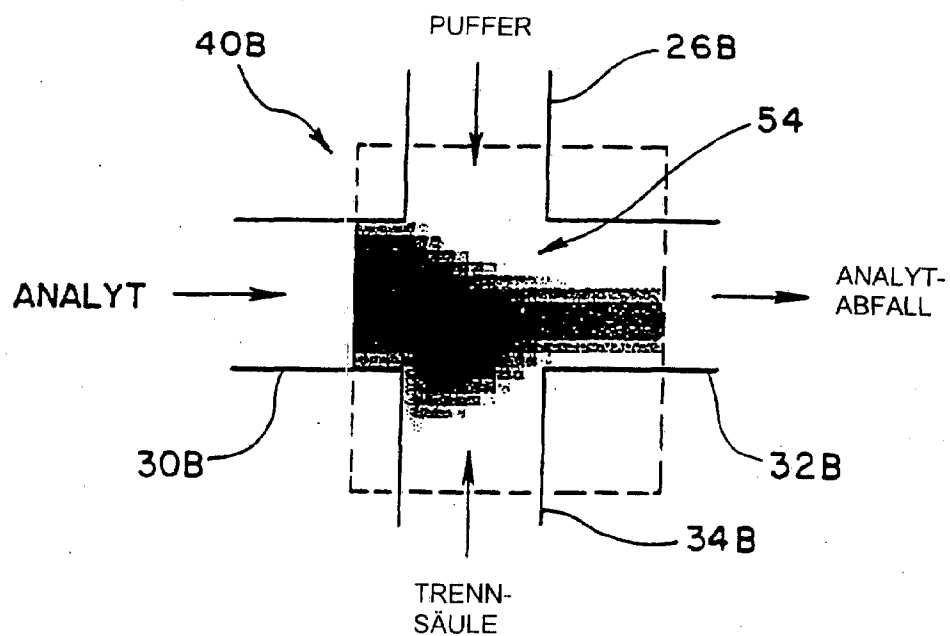


FIG. 6

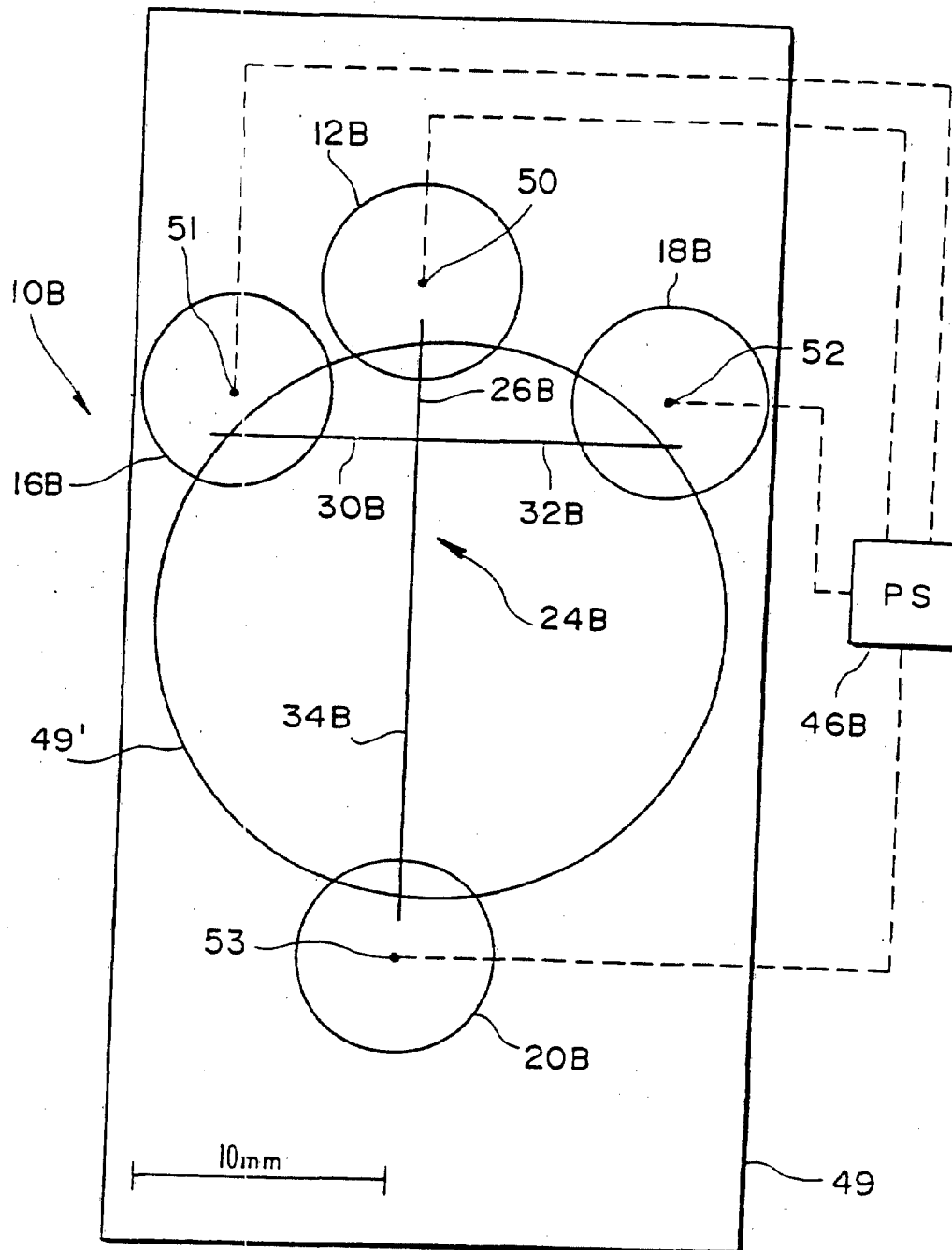


FIG. 8(a)

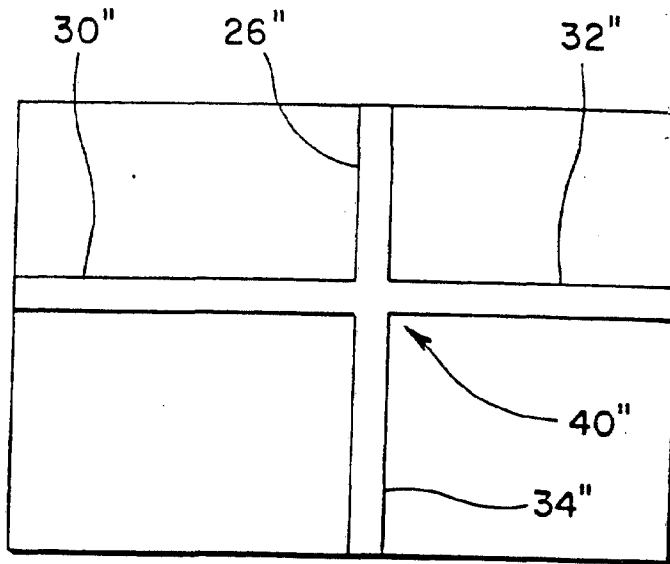


FIG. 8(b)

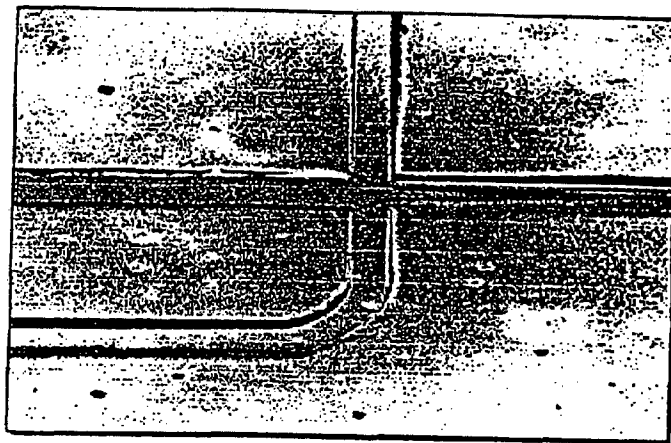


FIG. 8(c)

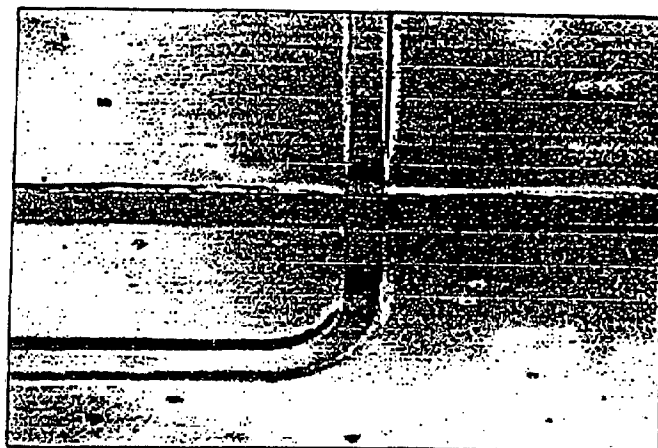


FIG. 9

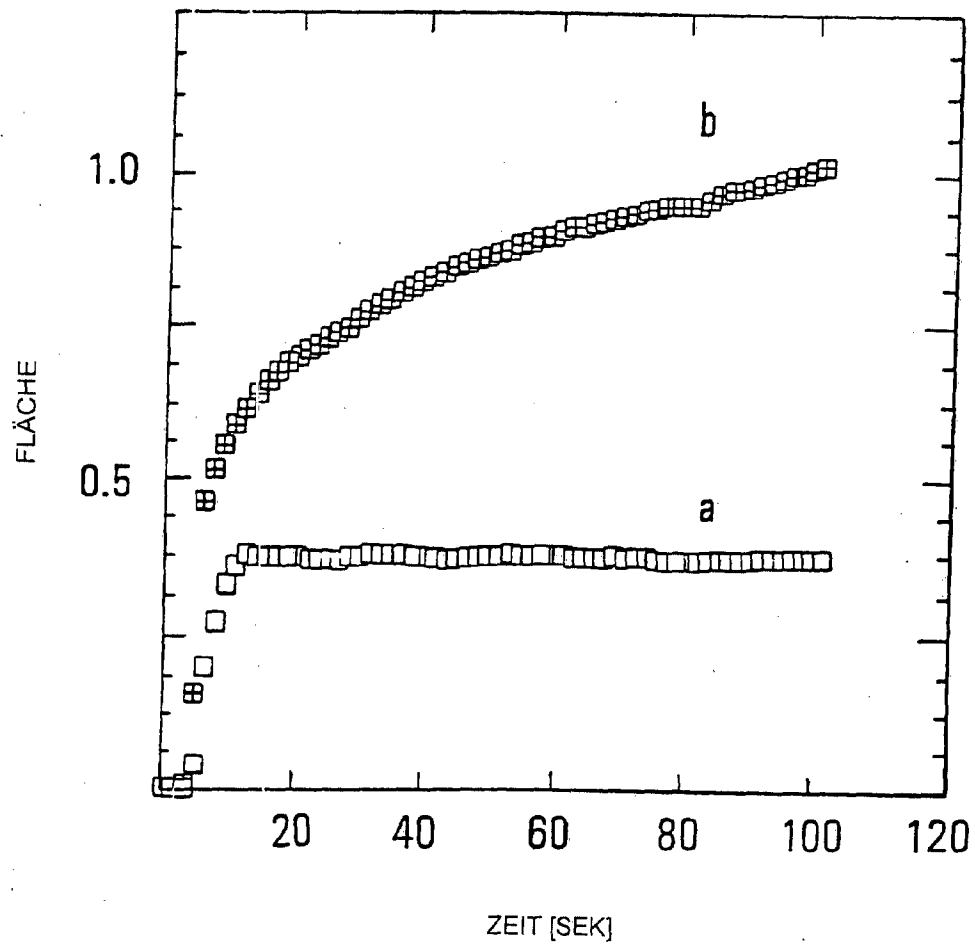


FIG. 10

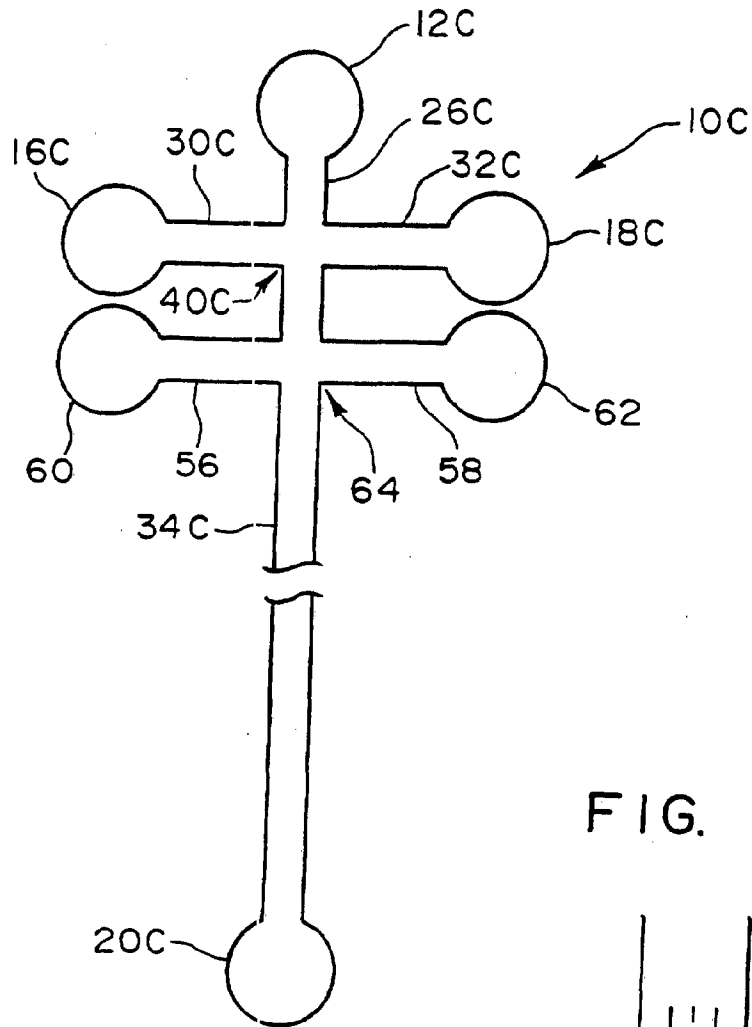


FIG. 11

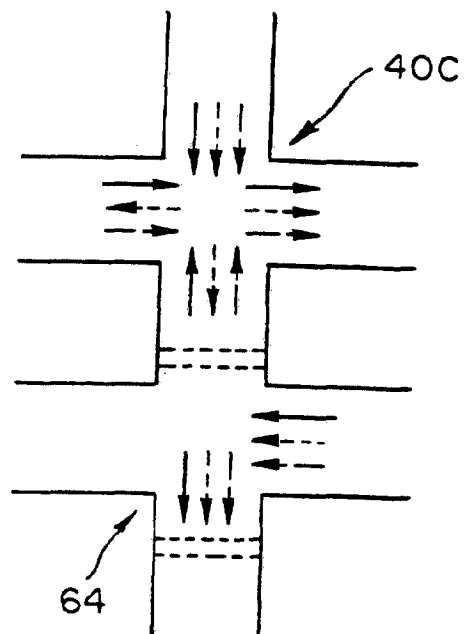


FIG. 12

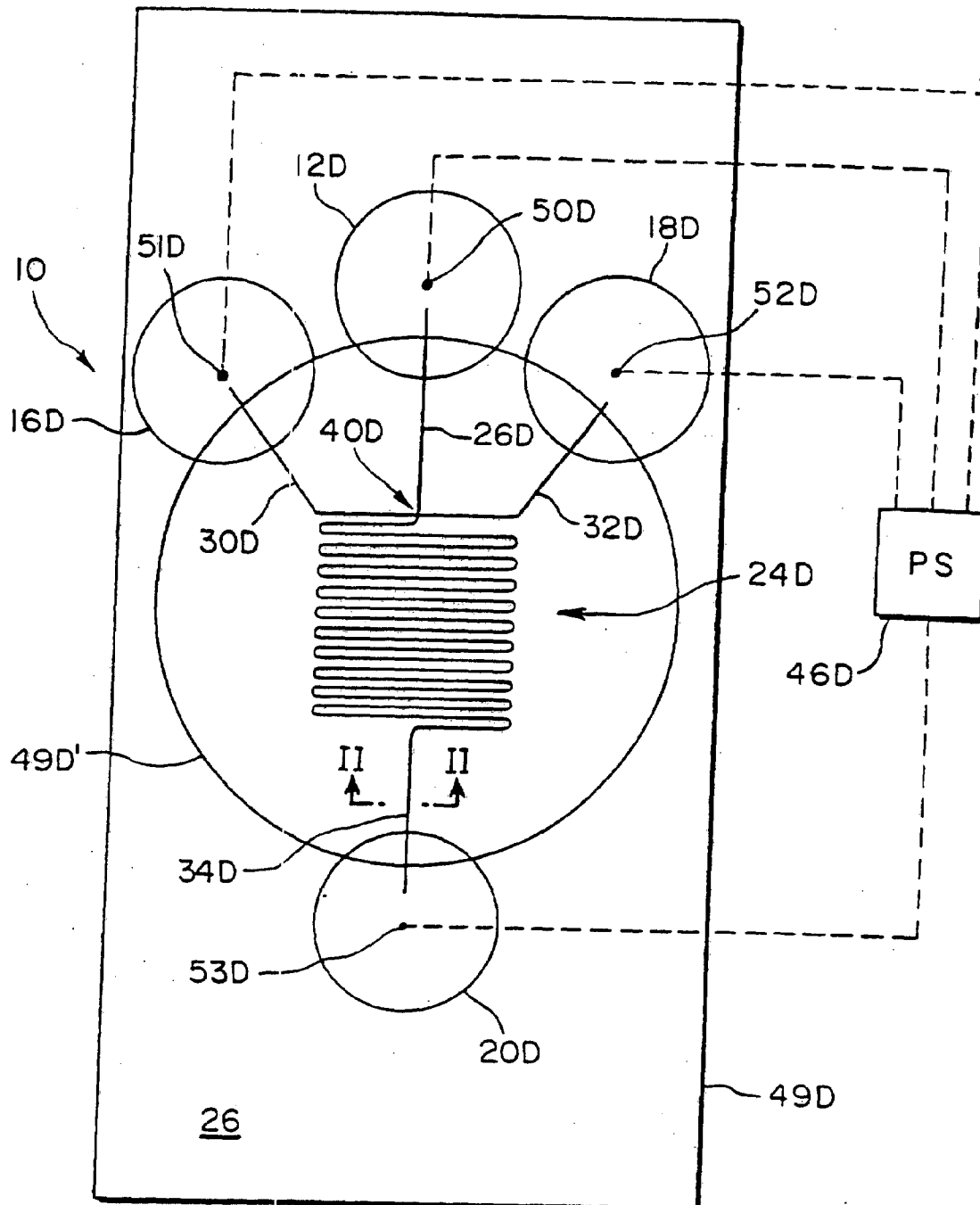


FIG. 13(a)

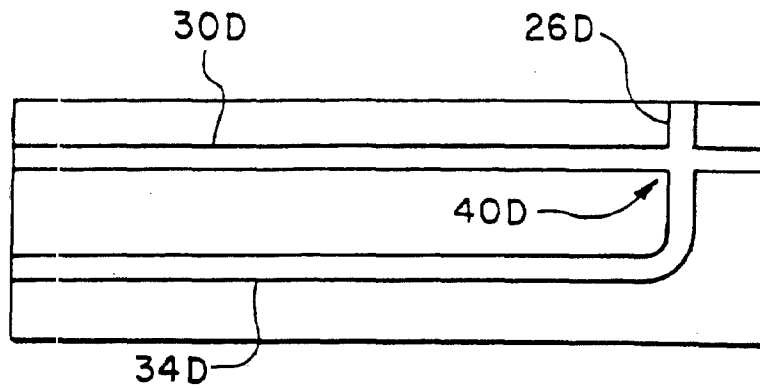


FIG. 13(b)

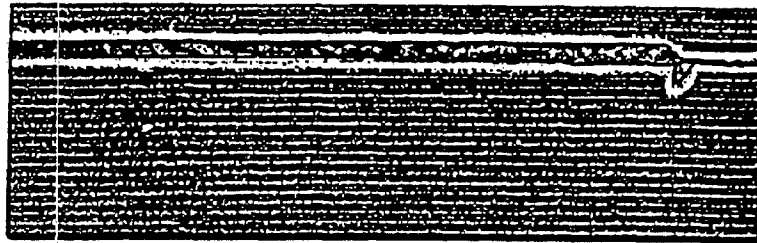


FIG. 13(c)

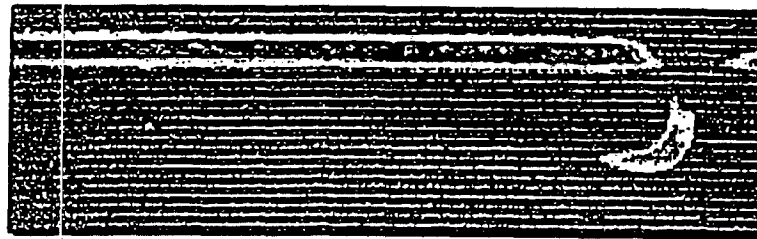


FIG. 13(d)



FIG. 13(e)

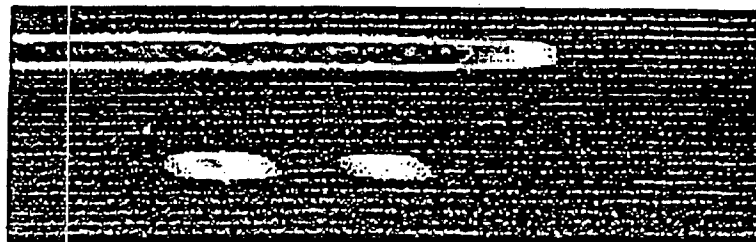




FIG. 14

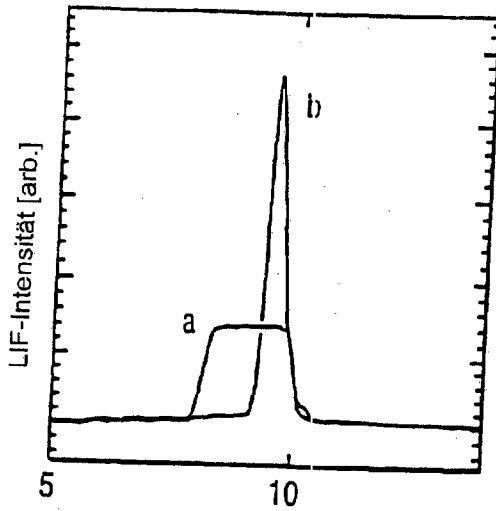


FIG. 15

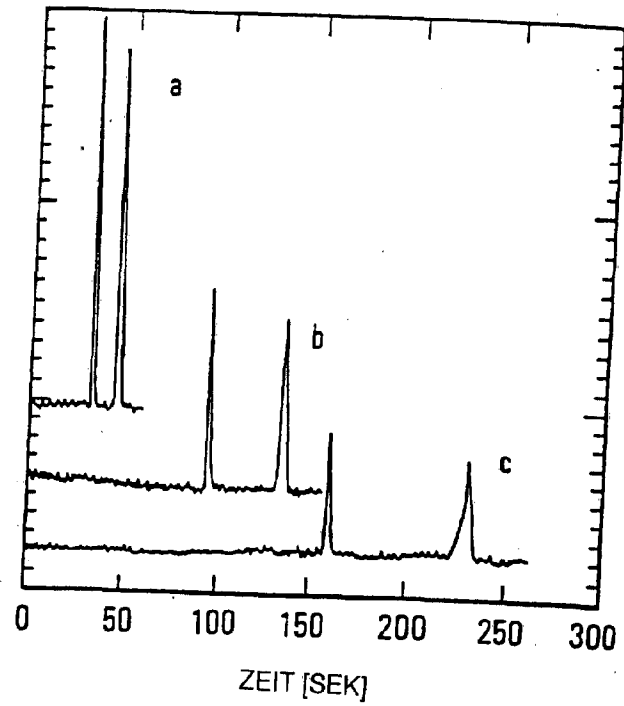


FIG. 16

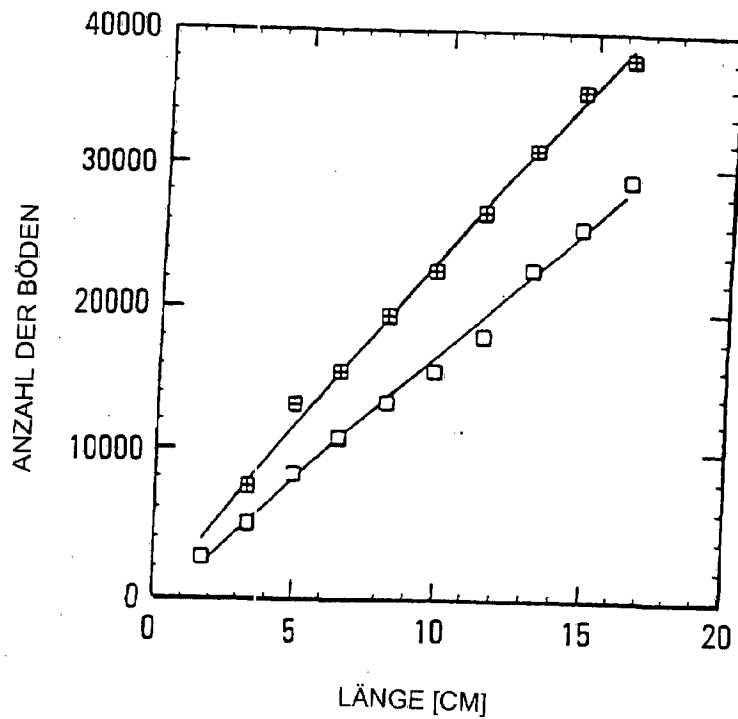


FIG. 17(a)

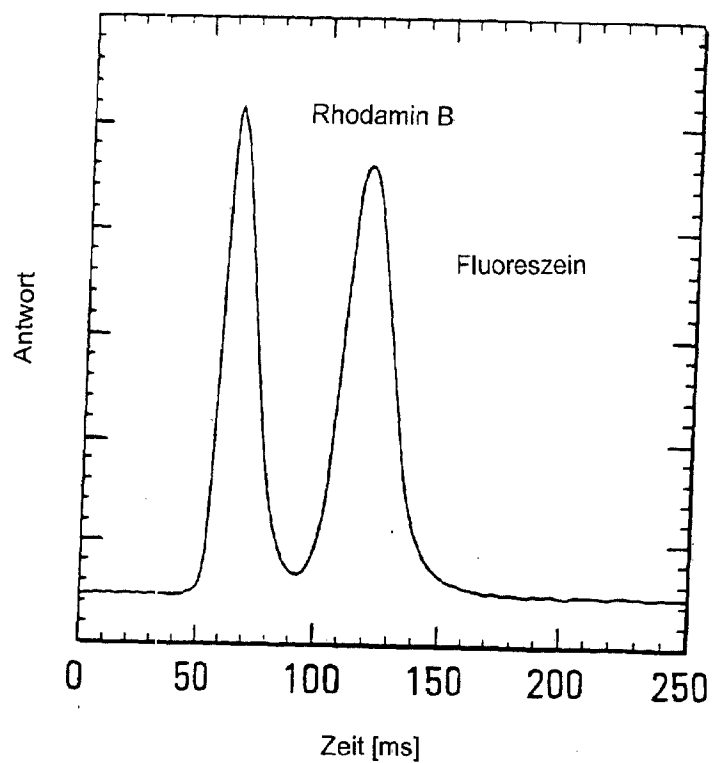


FIG. 17(b)

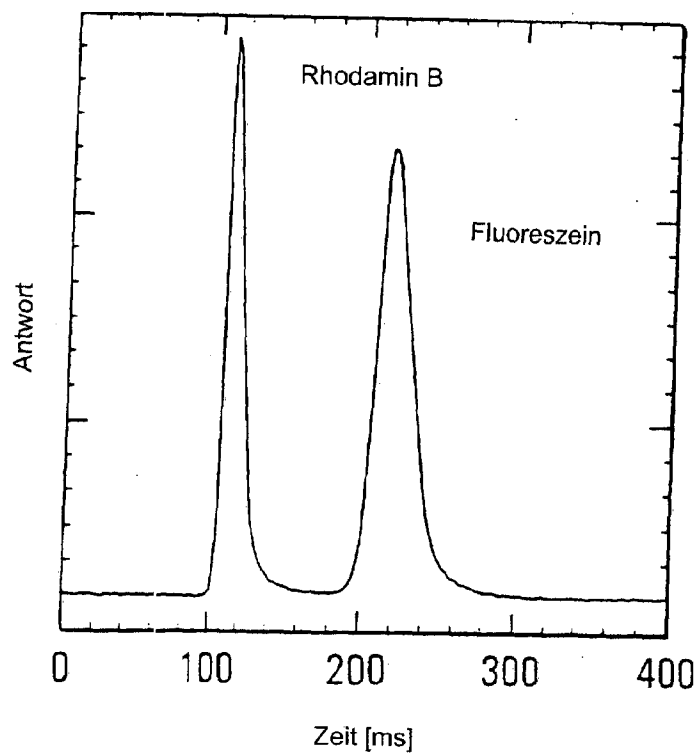


FIG. 17(c)

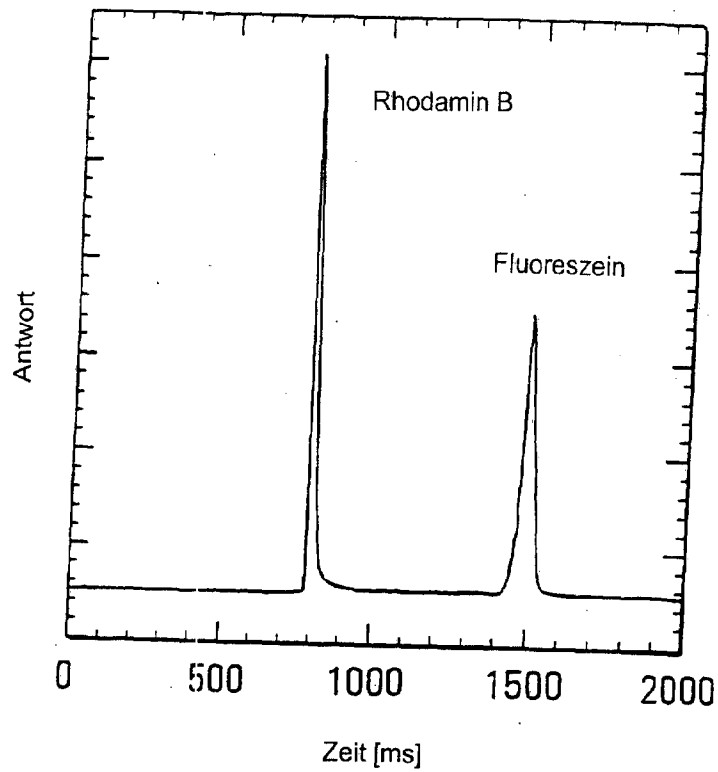


FIG. 18

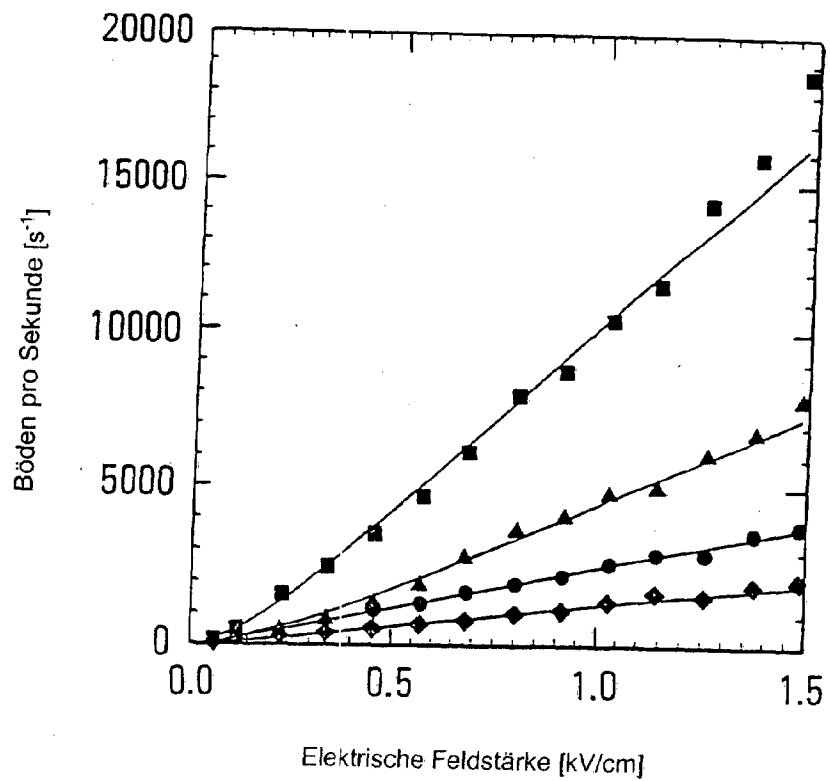


FIG. 19

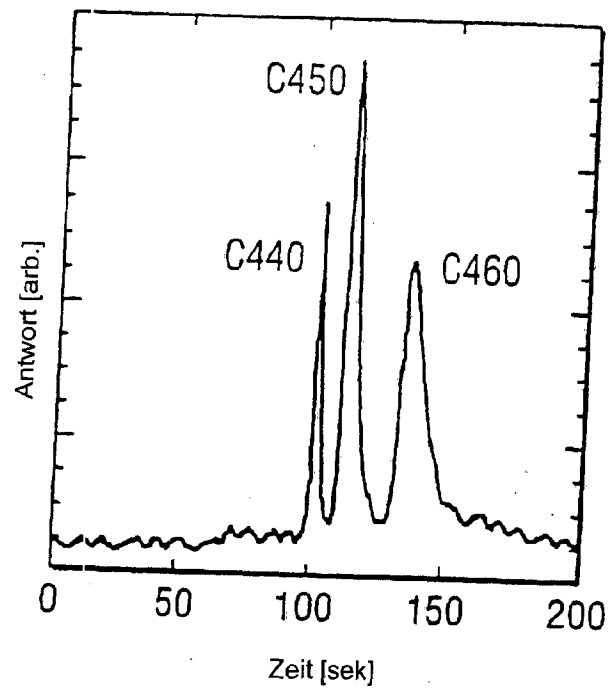


FIG. 20

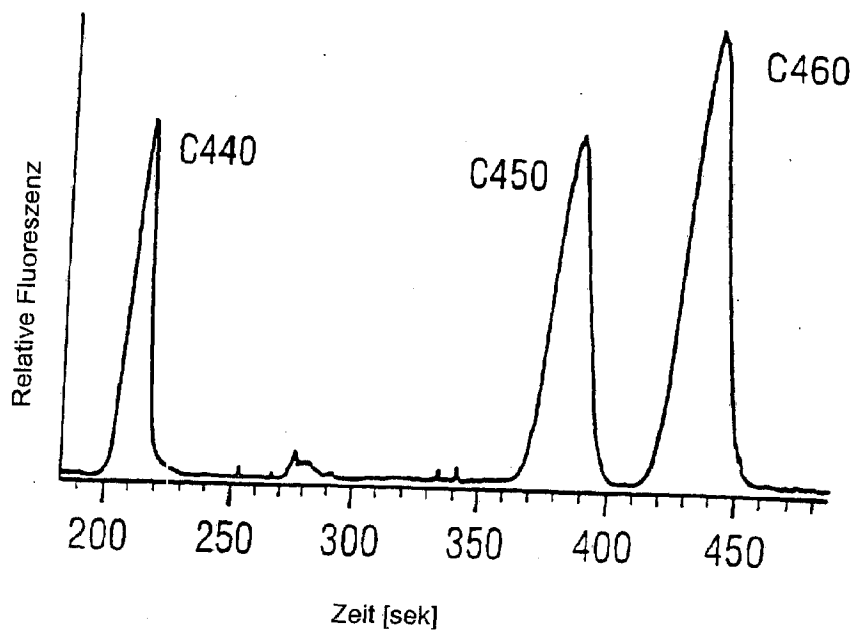


FIG. 21(a)

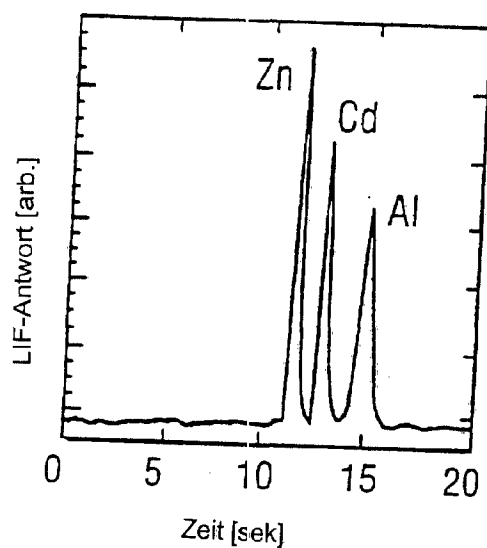


FIG. 21(b)

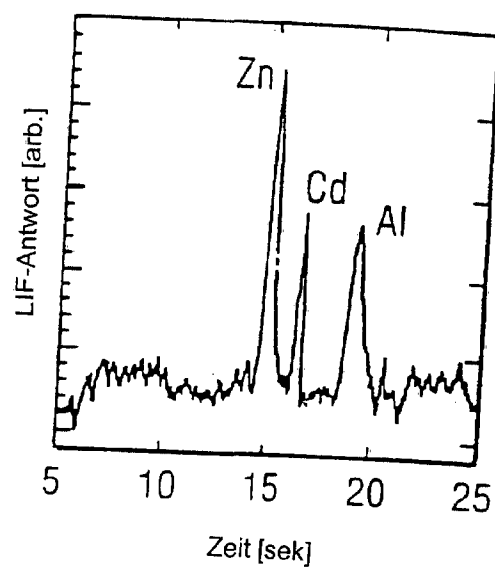


FIG. 24

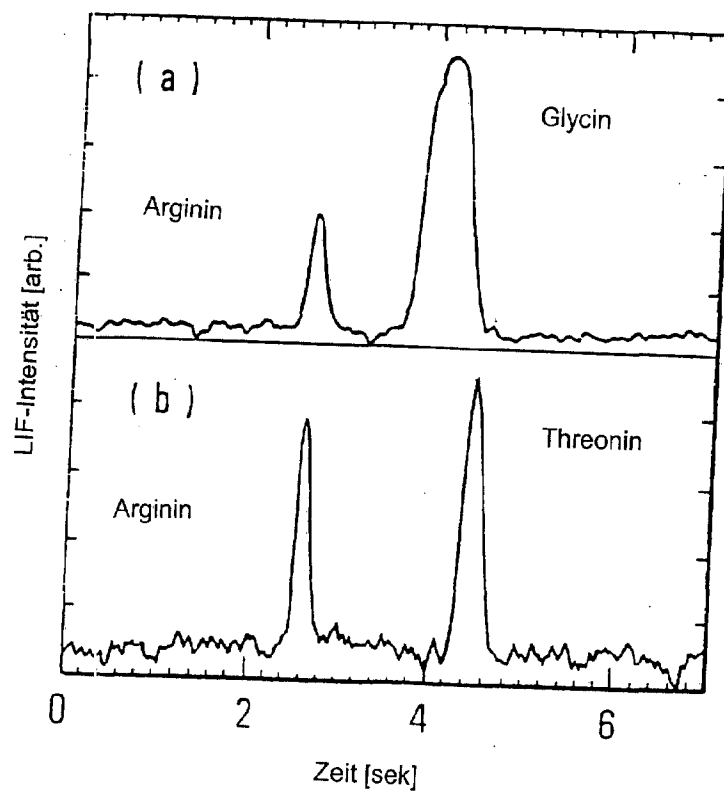


FIG. 22

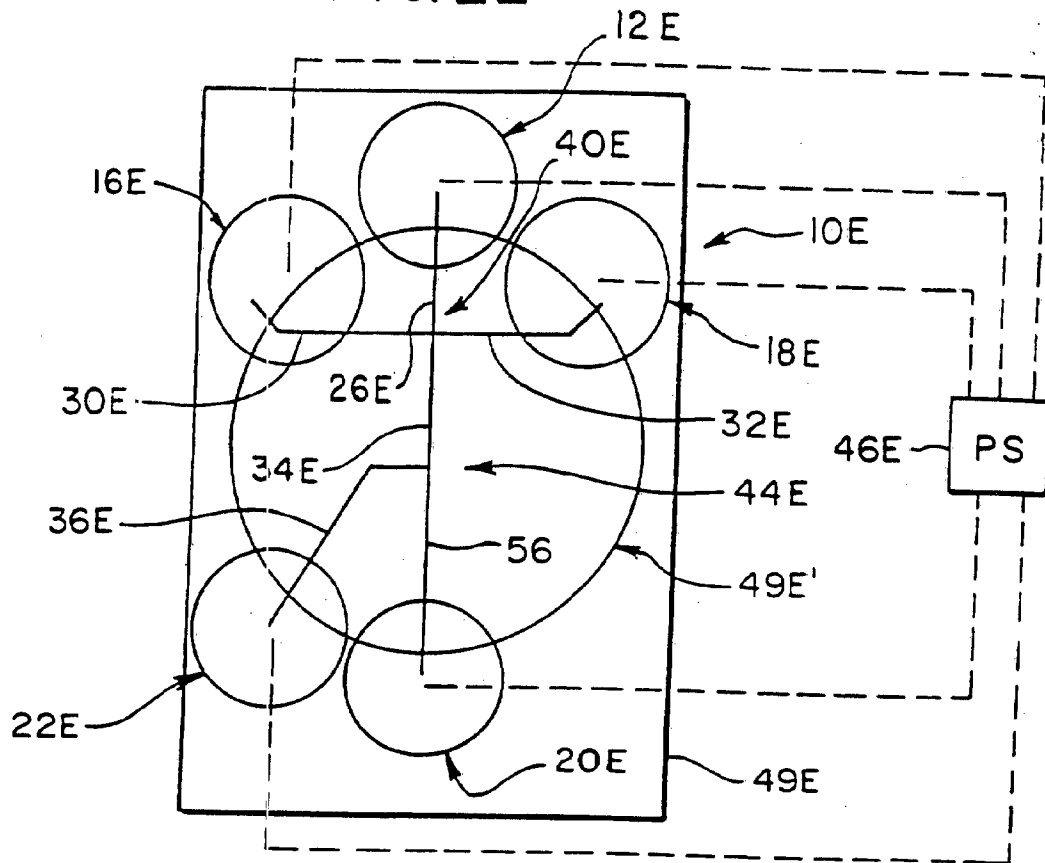


FIG. 23

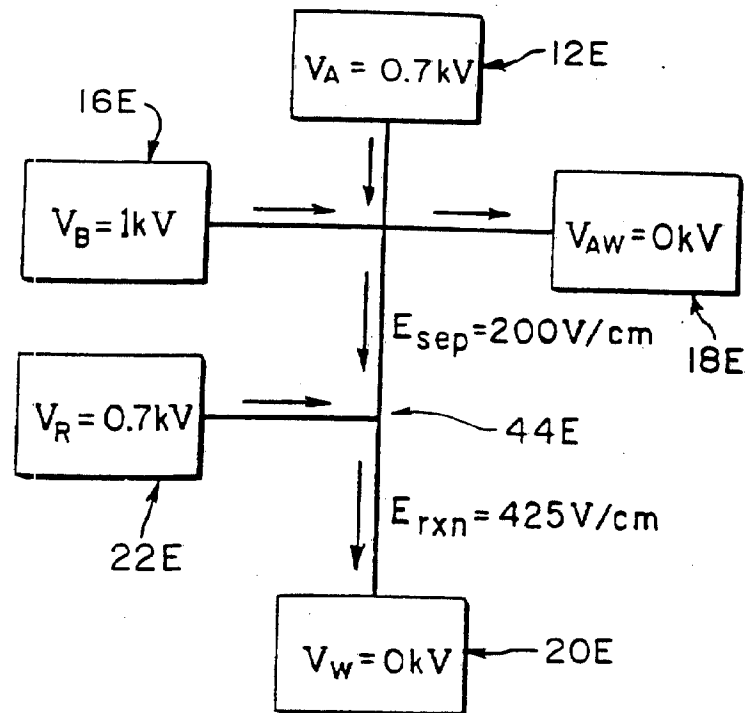


FIG. 25

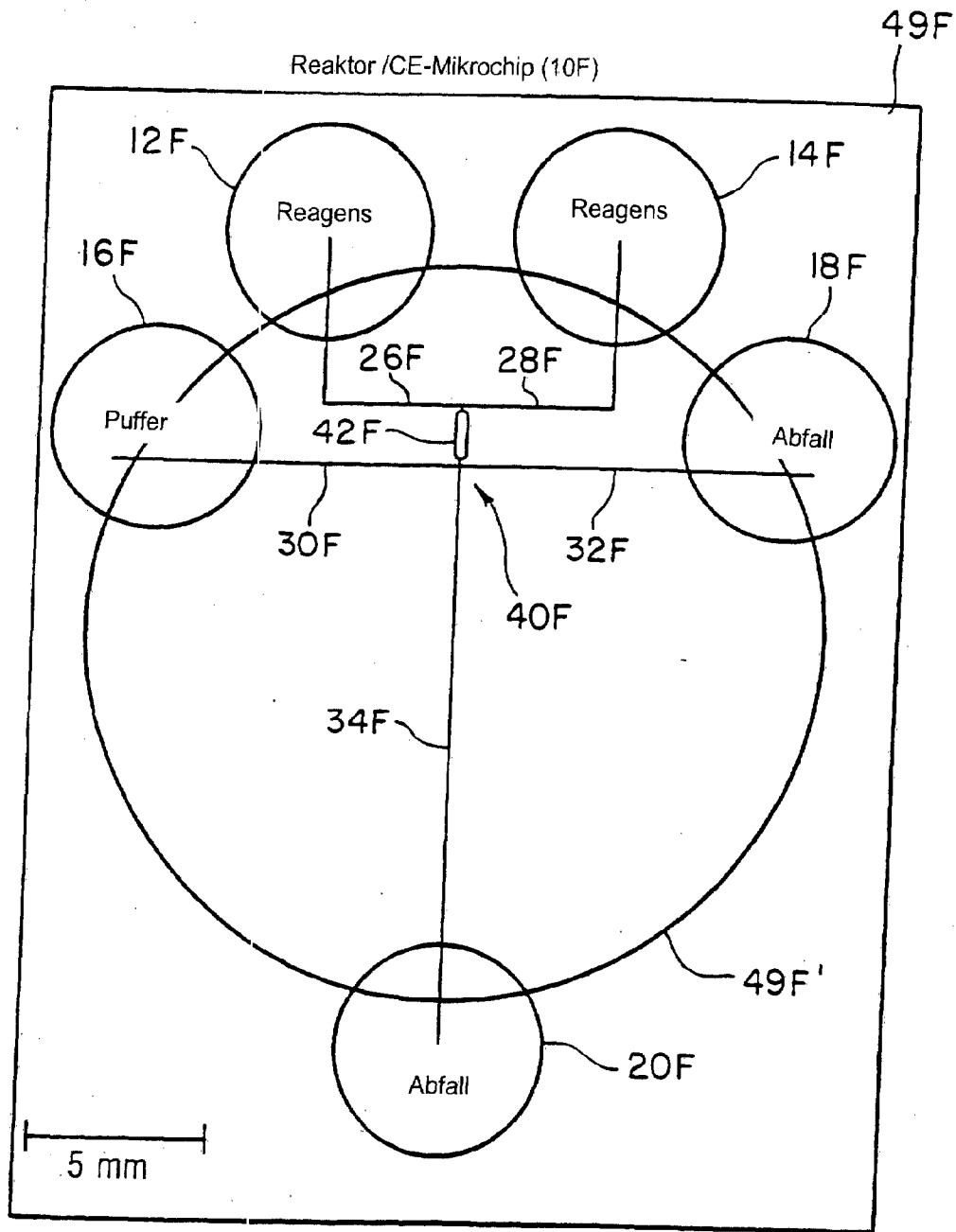


FIG. 26

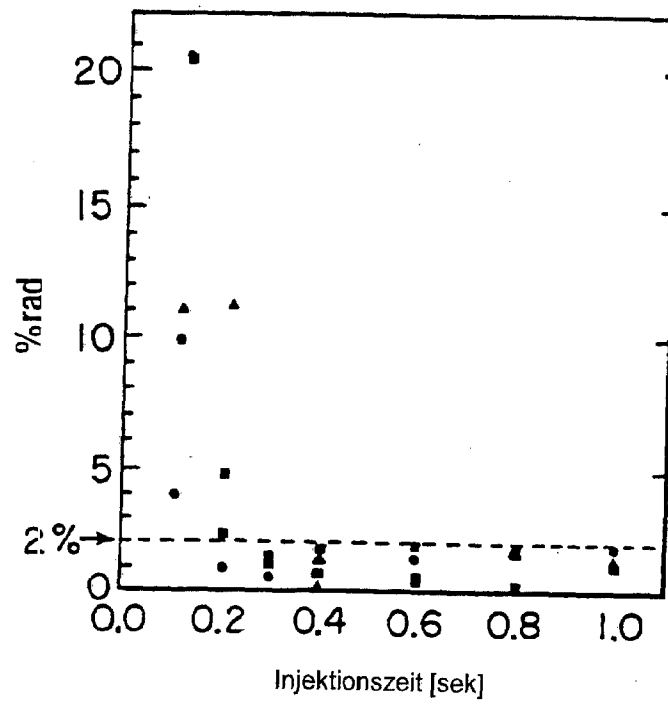


FIG. 27

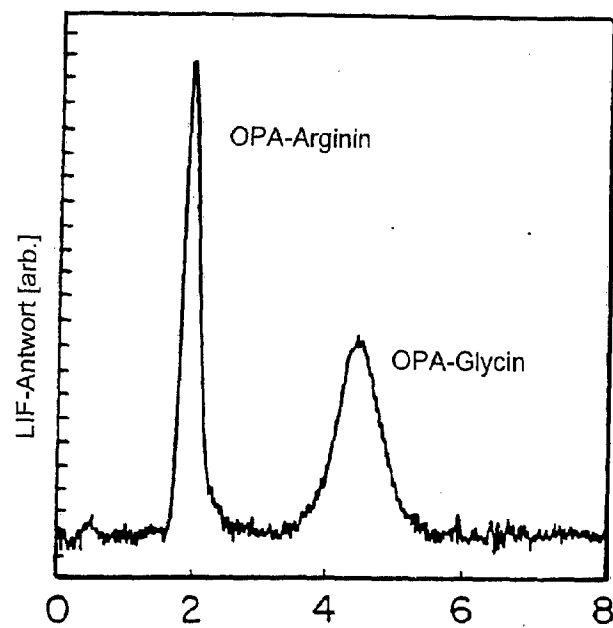




FIG. 28

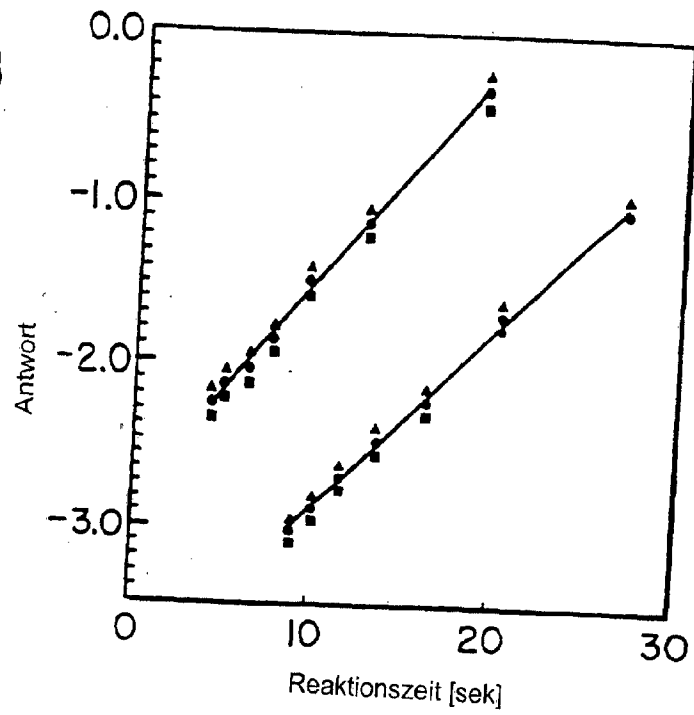


FIG. 29

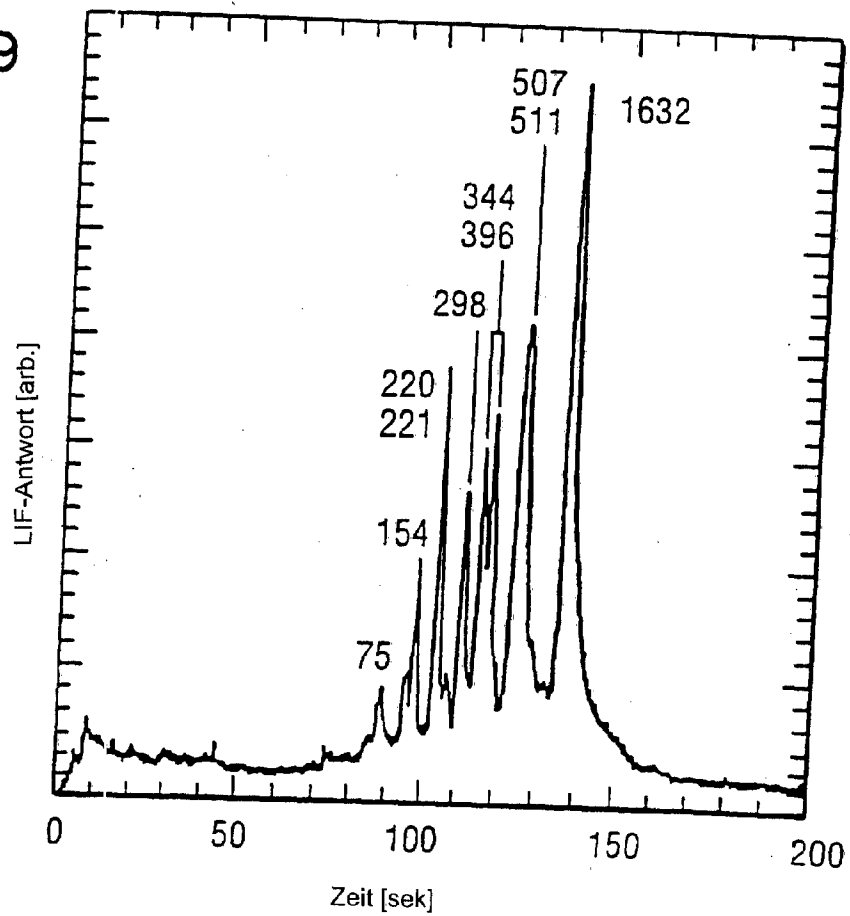


FIG. 30

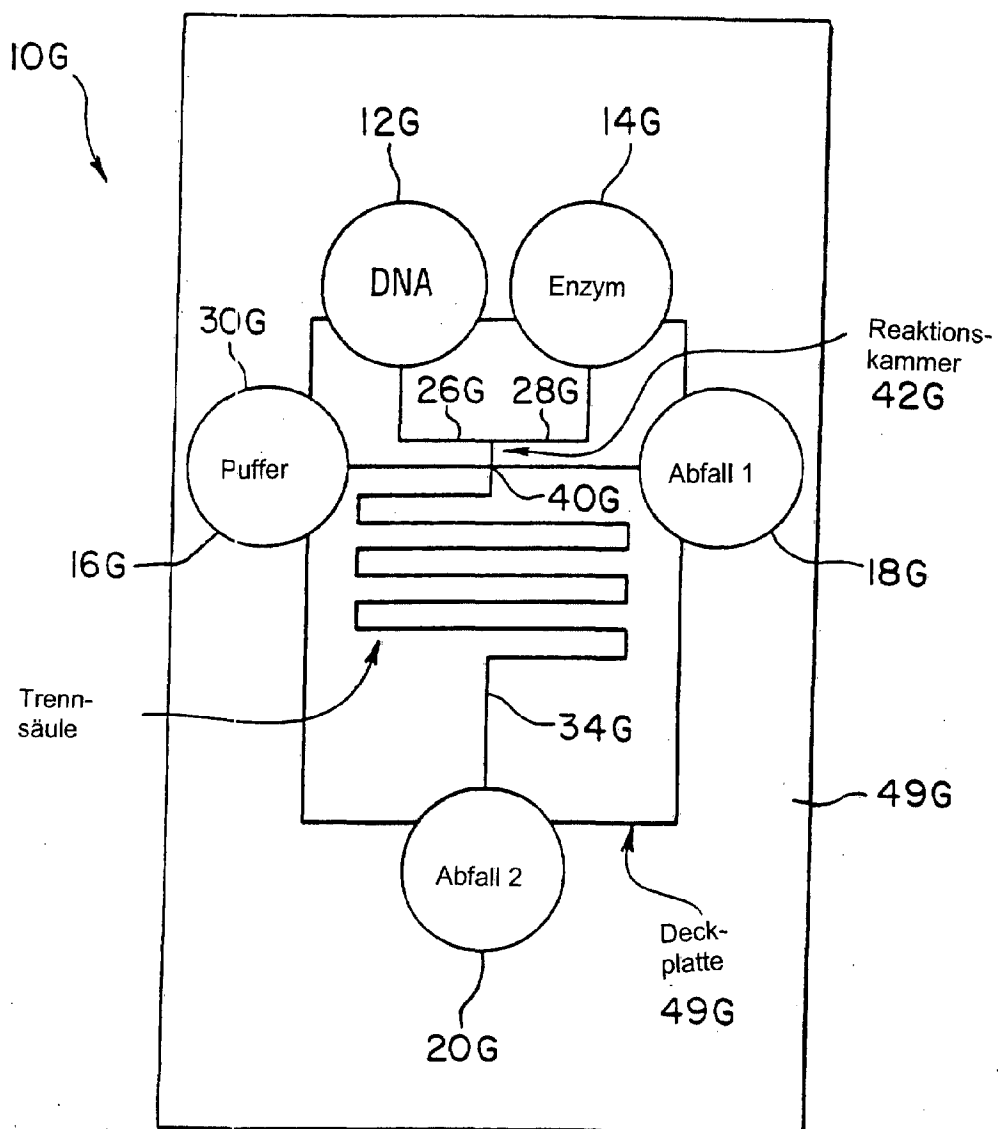


FIG. 31(a)

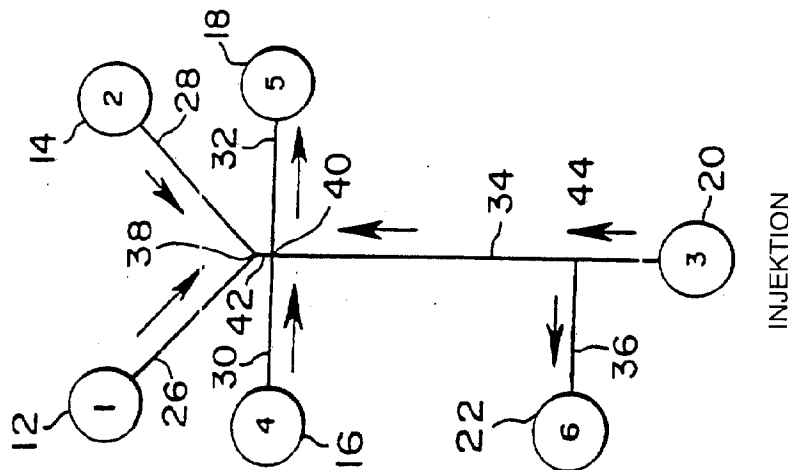


FIG. 31(b)

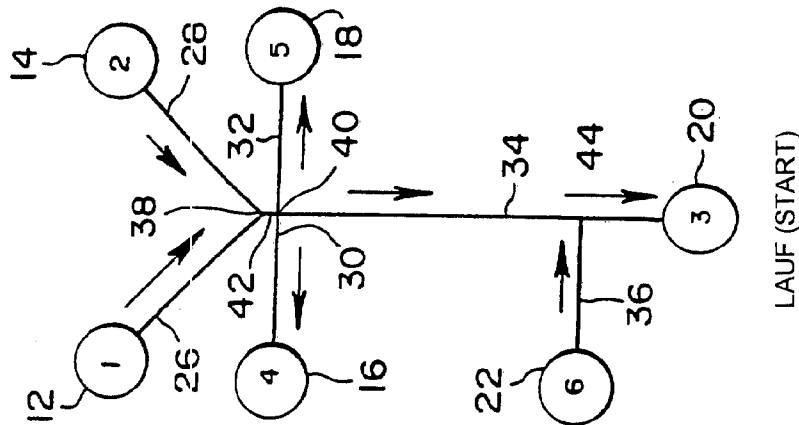
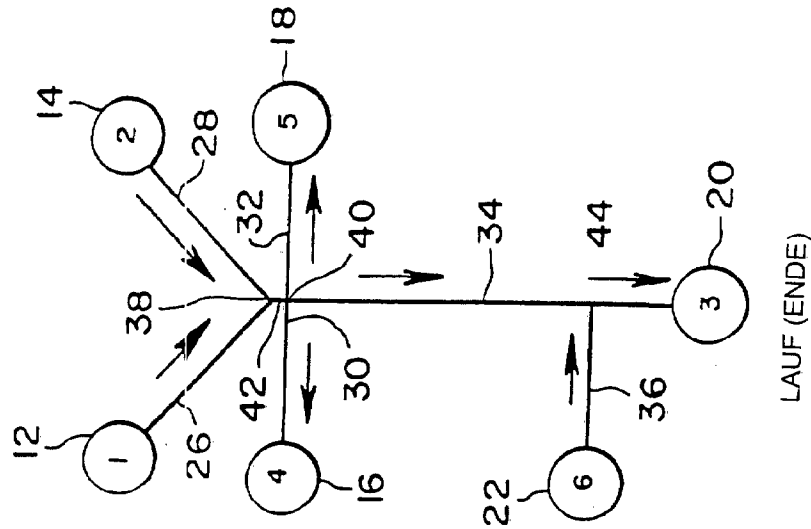


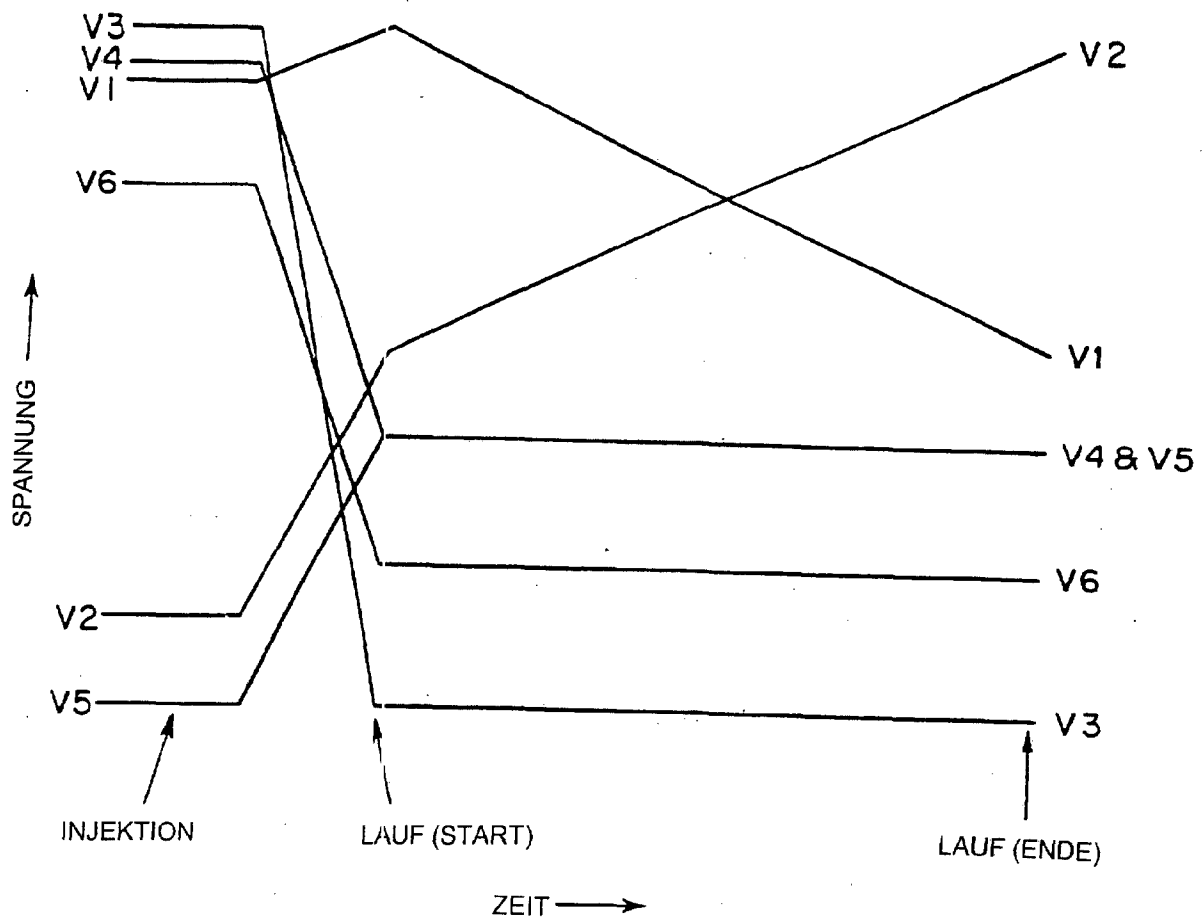
FIG. 31(c)



07.01.03

21/21

FIG. 32





US005858195A

**United States Patent** [19]  
**Ramsey**

[11] **Patent Number:** **5,858,195**  
[45] **Date of Patent:** **Jan. 12, 1999**

[54] **APPARATUS AND METHOD FOR  
PERFORMING MICROFLUIDIC  
MANIPULATIONS FOR CHEMICAL  
ANALYSIS AND SYNTHESIS**

[75] Inventor: **J. Michael Ramsey**, Knoxville, Tenn.

[73] Assignee: **Lockheed Martin Energy Research  
Corporation**, Oak Ridge, Tenn.

[21] Appl. No.: **776,645**

[22] PCT Filed: **Aug. 1, 1995**

[86] PCT No.: **PCT/US95/09492**

§ 371 Date: **Feb. 3, 1997**

§ 102(e) Date: **Feb. 3, 1997**

[87] PCT Pub. No.: **WO96/04547**

PCT Pub. Date: **Feb. 15, 1996**

#### Related U.S. Application Data

[63] Continuation-in-part of Ser. No. 283,769, Aug. 1, 1994.

[51] **Int. Cl.<sup>6</sup>** ..... **G01N 27/26; G01N 27/447**

[52] **U.S. Cl.** ..... **204/601; 204/450; 204/451;  
204/600**

[58] **Field of Search** ..... **204/450, 451,  
204/452, 453, 455, 600, 601, 602, 603,  
604, 605**

[56] **References Cited**

#### U.S. PATENT DOCUMENTS

4,390,403	6/1983	Batchelder	204/547
4,908,112	3/1990	Pace	204/601 X
5,073,239	12/1991	Hjerten	204/453
5,092,973	3/1992	Zare et al.	204/452
5,110,431	5/1992	Moring	204/451
5,126,022	6/1992	Soane et al.	204/458
5,132,012	7/1992	Miura et al.	210/198 Z
5,141,621	8/1992	Zare et al.	204/453
5,180,480	1/1993	Manz	204/299 R
5,229,297	7/1993	Schnipelsky et al.	436/94

5,250,263	10/1993	Manz	422/81
5,288,463	2/1994	Chemelli	422/58
5,296,114	3/1994	Manz	204/180.1
5,376,252	12/1994	Ekstrom et al.	204/604 X
5,429,734	7/1995	Gajar et al.	204/603
5,585,069	12/1996	Zanzucchi et al.	422/100
5,603,351	2/1997	Cherukuri et al.	137/597
5,605,662	2/1997	Heller et al.	422/68.1
5,750,015	5/1998	Soane et al.	204/454

#### FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0 356 160 A2	2/1990	European Pat. Off. .
0 620 432 A1	4/1993	European Pat. Off. .
620432	10/1994	European Pat. Off. .
2 191 110	12/1987	United Kingdom .

#### OTHER PUBLICATIONS

M. Deml, F. Foret and P. Bozek "Electric Sample Splitter for Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography*, 320 (1985) 159-165.

Manz, et al., "Micromachining of Monocrystalline Silicon and Glass for Chemical Analysis Systems", *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 10 No. 5, pp. 144-149 (1991).

(List continued on next page.)

*Primary Examiner*—Robert J. Warden

*Assistant Examiner*—John S. Starsiak, Jr.

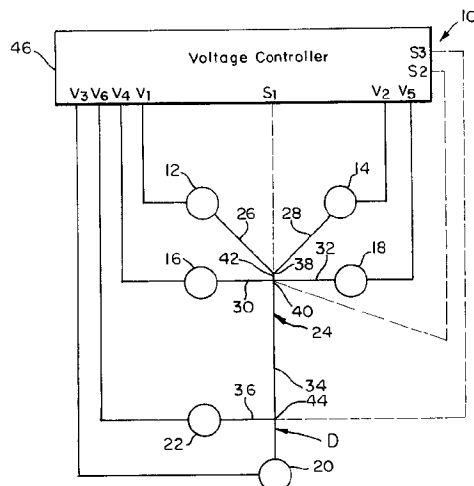
*Attorney, Agent, or Firm*—Dann, Dorfman, Herrell and Skillman

[57]

#### ABSTRACT

A microchip laboratory system and method provide fluid manipulations for a variety of applications, including sample injection for microchip chemical separations. The microchip is fabricated using standard photolithographic procedures and chemical wet etching, with the substrate and cover plate joined using direct bonding. Capillary electrophoresis and electrochromatography are performed in channels formed in the substrate. Analytes are loaded into a four-way intersection of channels by electrokinetically pumping the analyte through the intersection, followed by switching of the potentials to force an analyte plug into the separation channel.

**25 Claims, 21 Drawing Sheets**



## OTHER PUBLICATIONS

Seiler, et al., "Planar Glass chips for Capillary Electrophoresis: Repetitive Sample Injection, Quantitation, and Separation Efficiency", *Analytical Chemistry*, vol. 65, No. 10 pp. 1481-1488 (1993).

Zhonghui, et al. "Micromachining of Capillary Electrophoresis Injectors and Separators on Glass Chips and Evaluation of Flow at Capillary Intersections", *Analytical Chemistry*, vol. 66, No. 1, pp. 177-184 (1994).

Jacobson, et al., "High-Speed Separations on a Microchip". *Analytical Chemistry*, vol. 66, No. 7, pp. 1114-1118 (1994).

Dasgupta, et al., "Electroosmosis: A Reliable Fluid Propulsion System for Flow Injection Analysis". *Analytical Chemistry*, pp. 1792-1798 (1995).

D. Jed Harrison, Karl Fluri, Kurt Seiler, Zhonghui Fan, Carlo S. Effenhauser, Andreas Manz, "Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis Based Chemical Analysis System in a Chip" *Science*, vol. 261 (Aug. 13, 1993) 895-897.

Stephen C. Jacobson et al, "Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices" *Analytical Chemistry*, vol. 66, No. 7 (Apr. 1994)1107-1113.

D. Jed Harrison et al, "Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip" *Analytical Chemistry*, vol. 64, No. 17 (Sep. 1992)1926-1932.

Carlo S. Effenhauser et al, "Glass Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separations with Submicrometer Plate Heights" *Analytical Chemistry*, vol. 65, No. 19 (Oct. 1993)2637-2642.

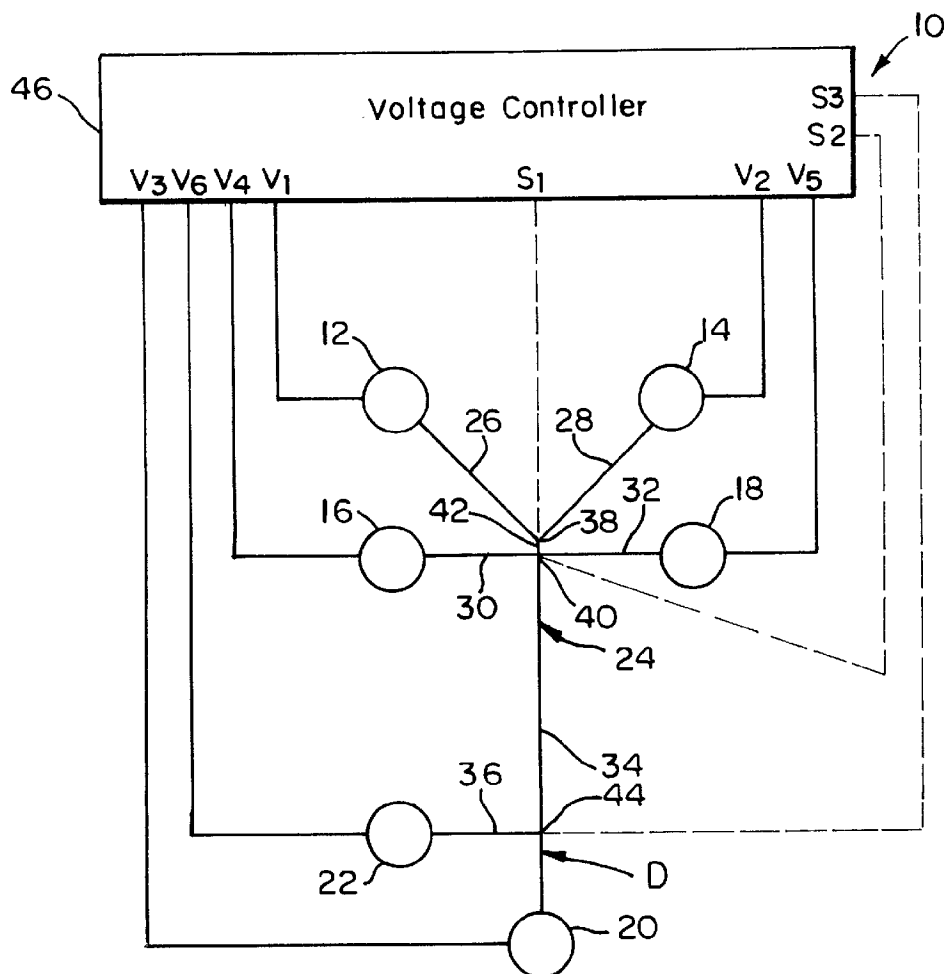


FIG. 1

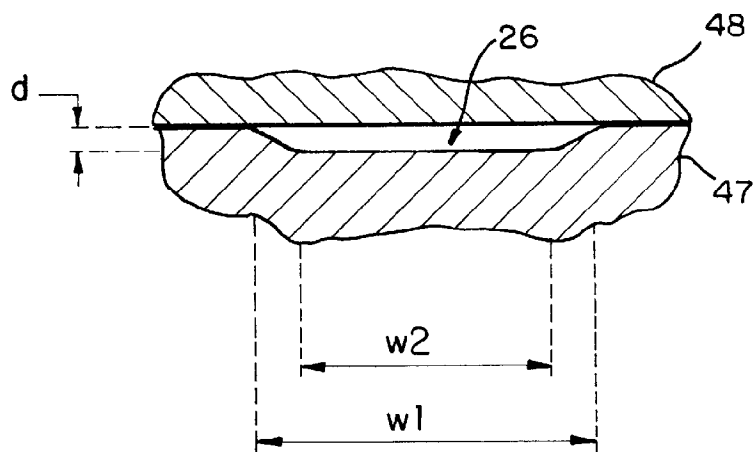


FIG. 2

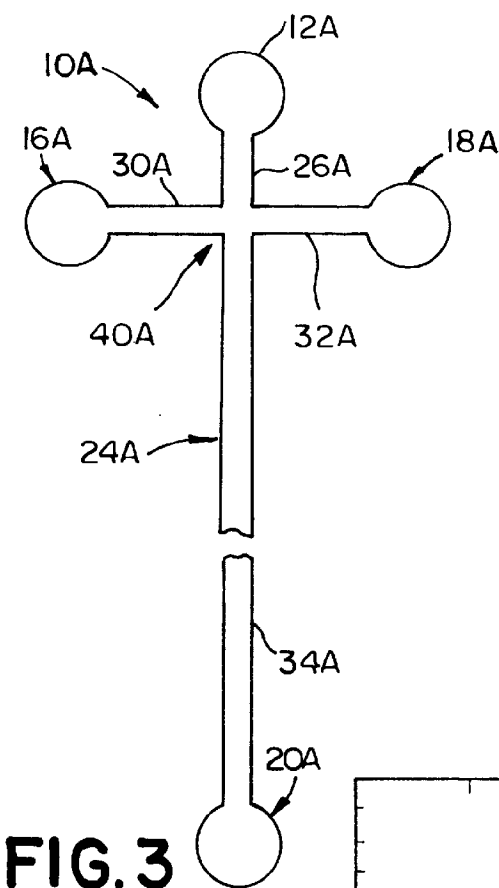


FIG. 3

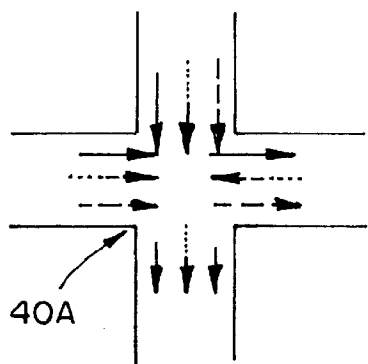


FIG. 4

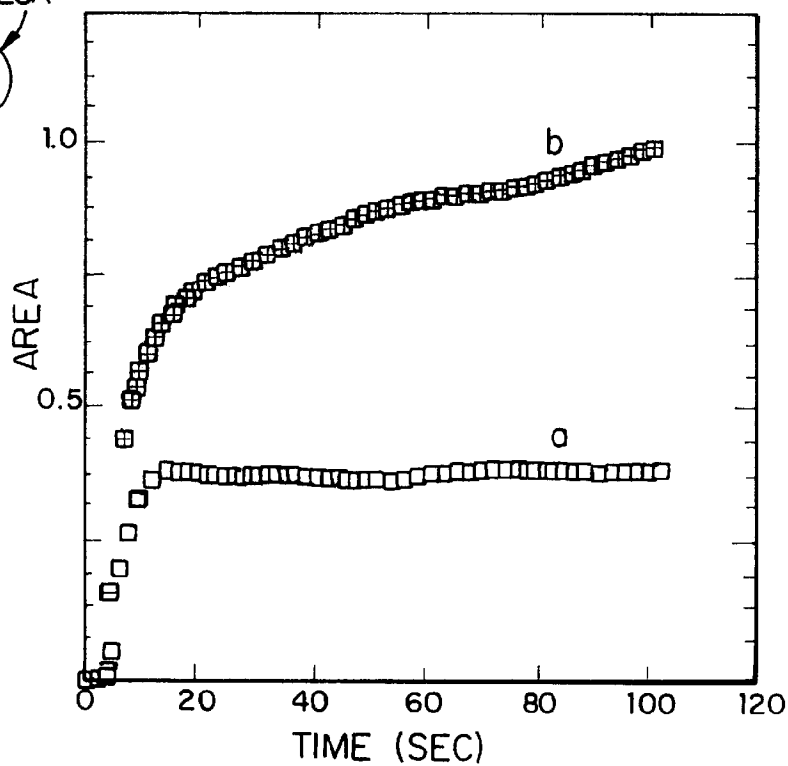


FIG. 9



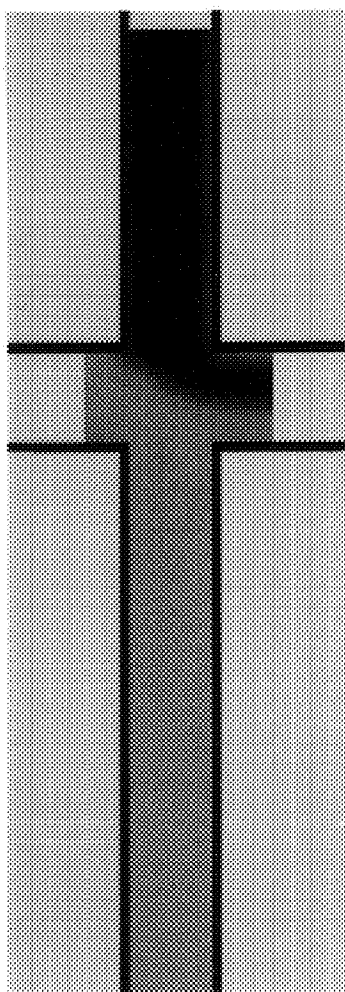


FIG. 5(A)

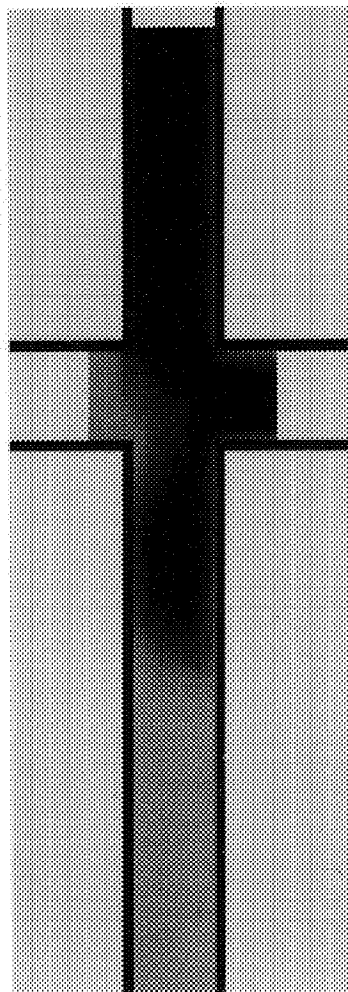


FIG. 5(B)

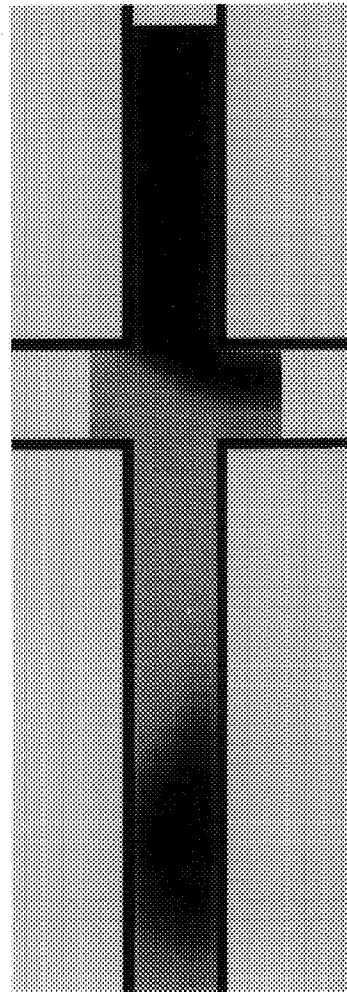


FIG. 5(C)

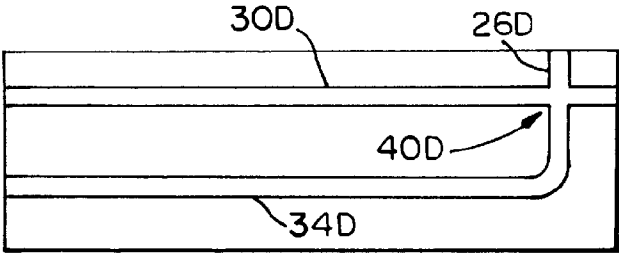
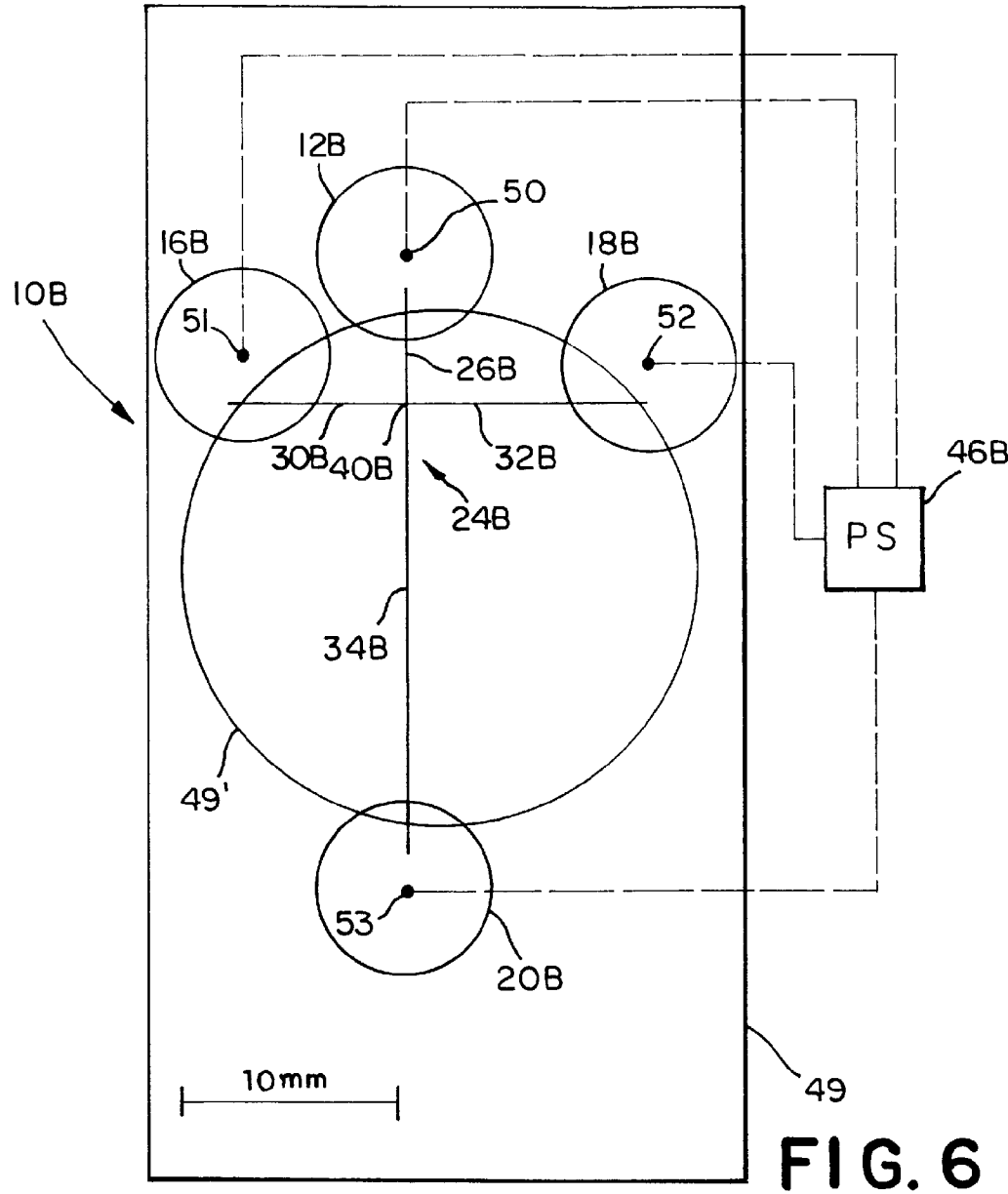
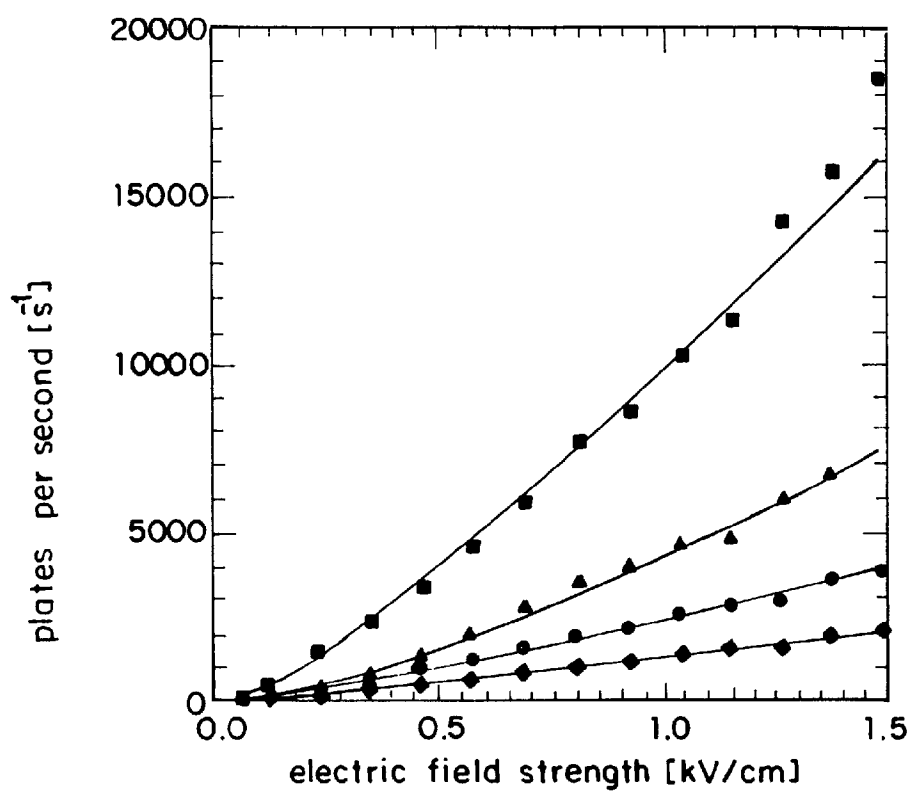
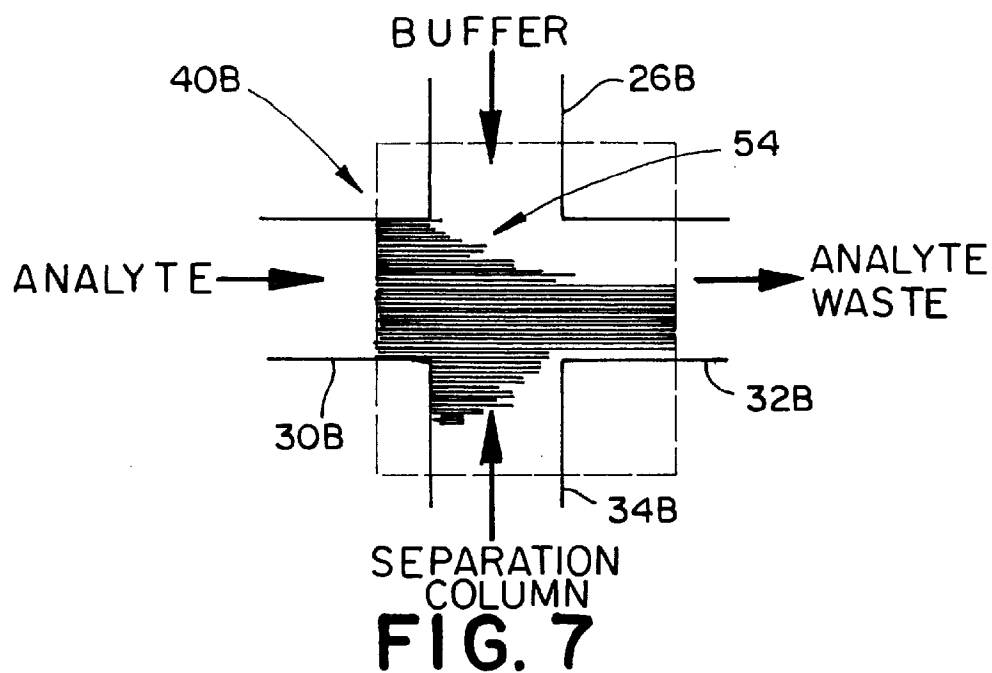
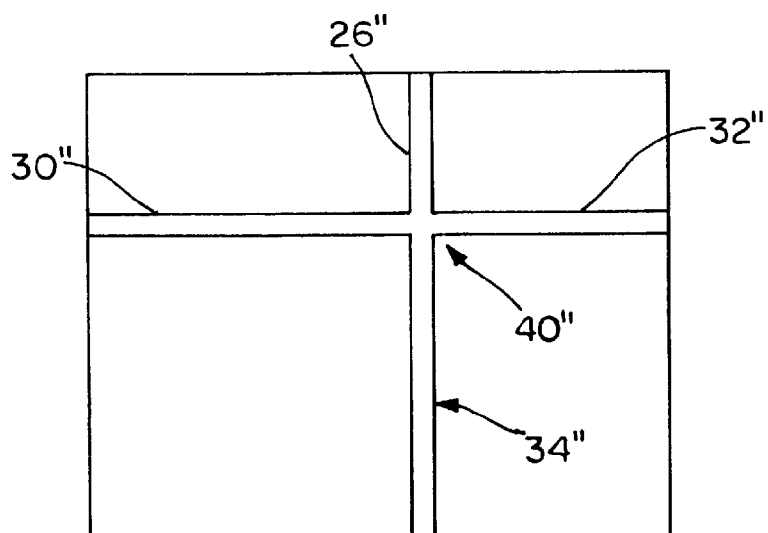
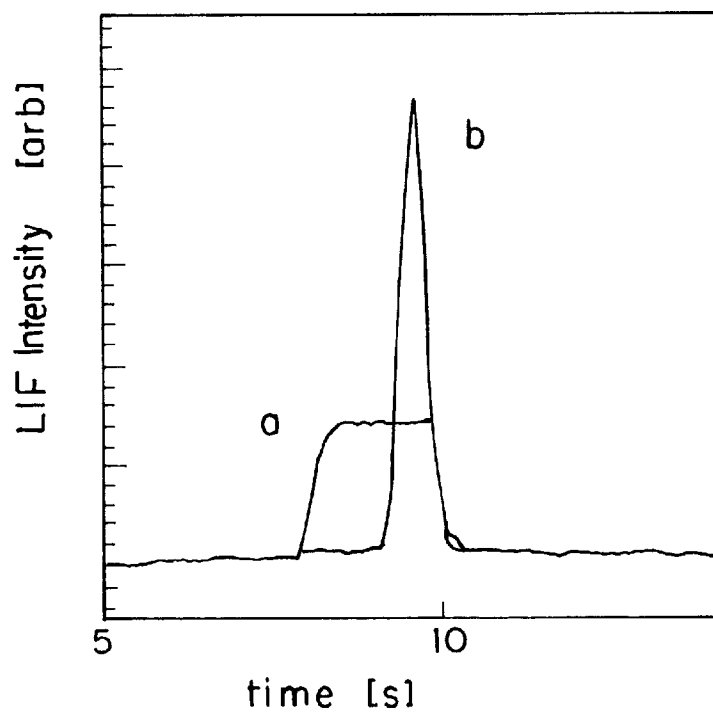


FIG. 13a





**FIG. 8a**



**FIG. 14**

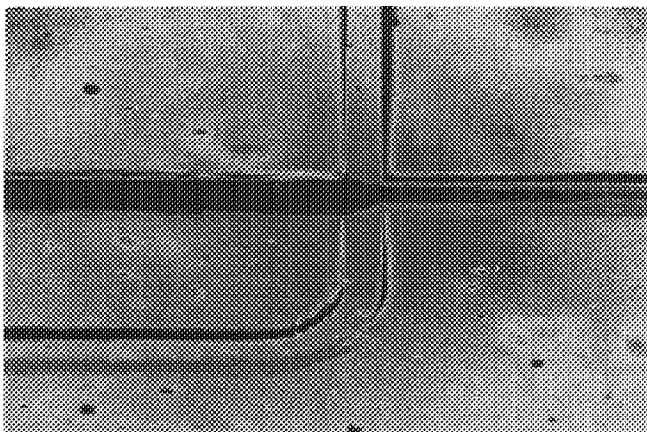


FIG. 8(b)

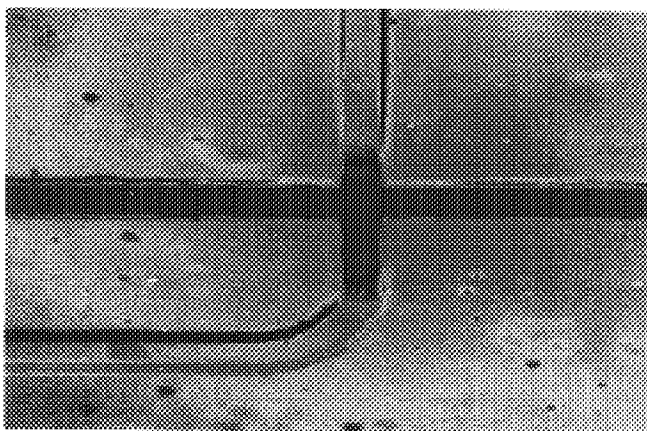


FIG. 8(c)

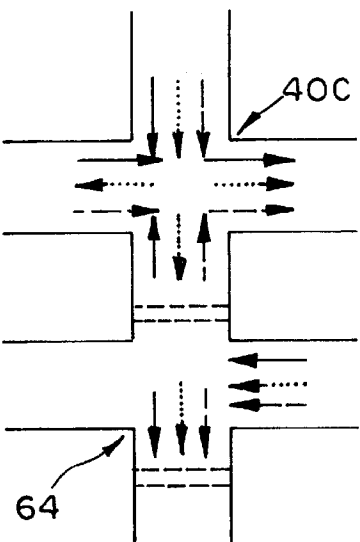
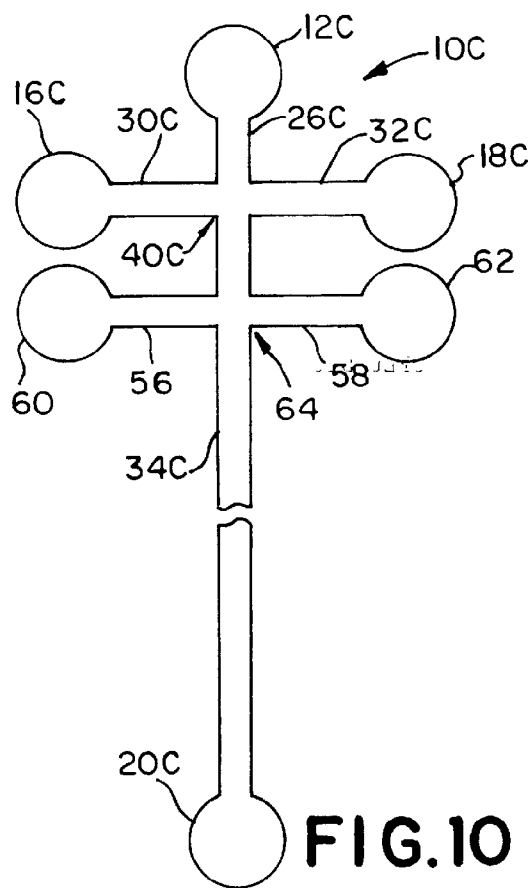


FIG. 11

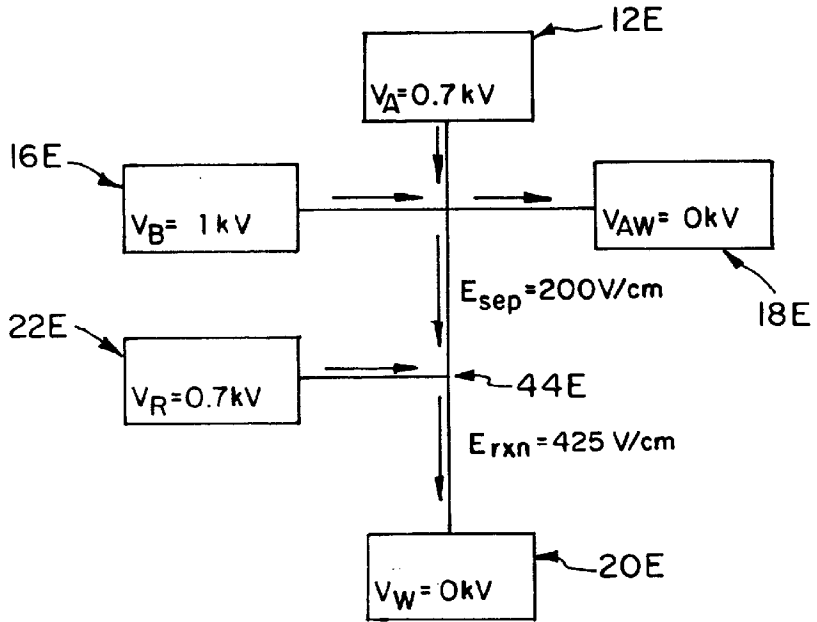


FIG. 23

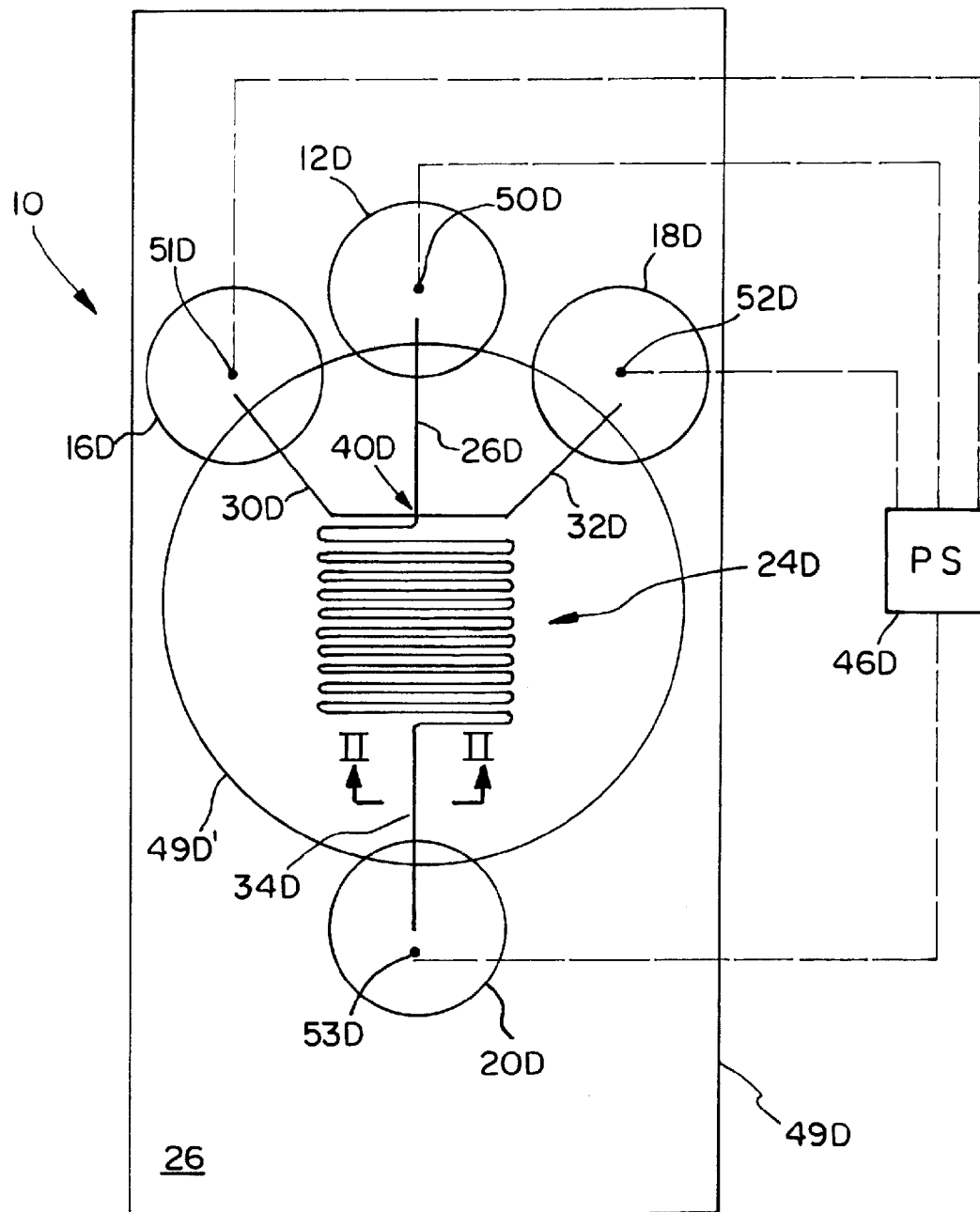


FIG. 12

FIG. 13(b)

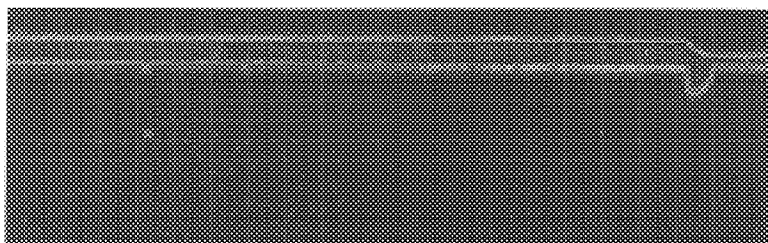


FIG. 13(c)

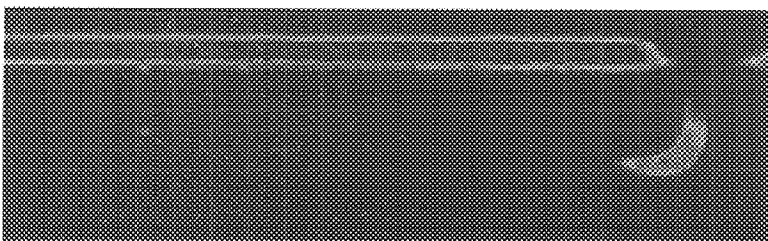


FIG. 13(d)

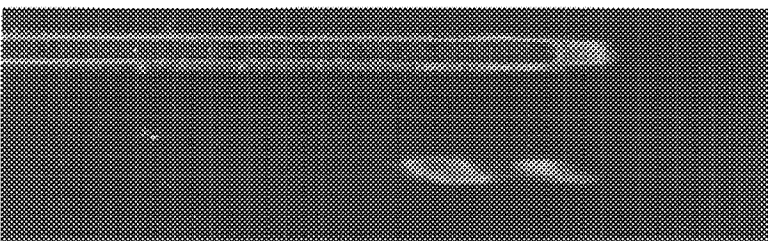


FIG. 13(e)

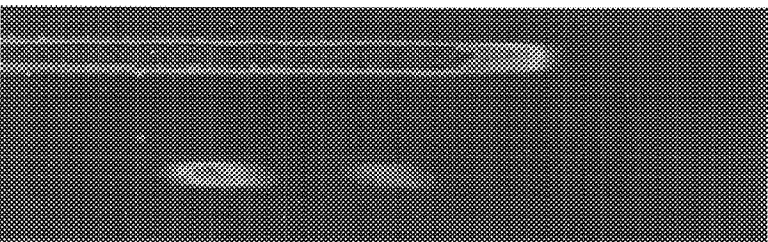




FIG.15

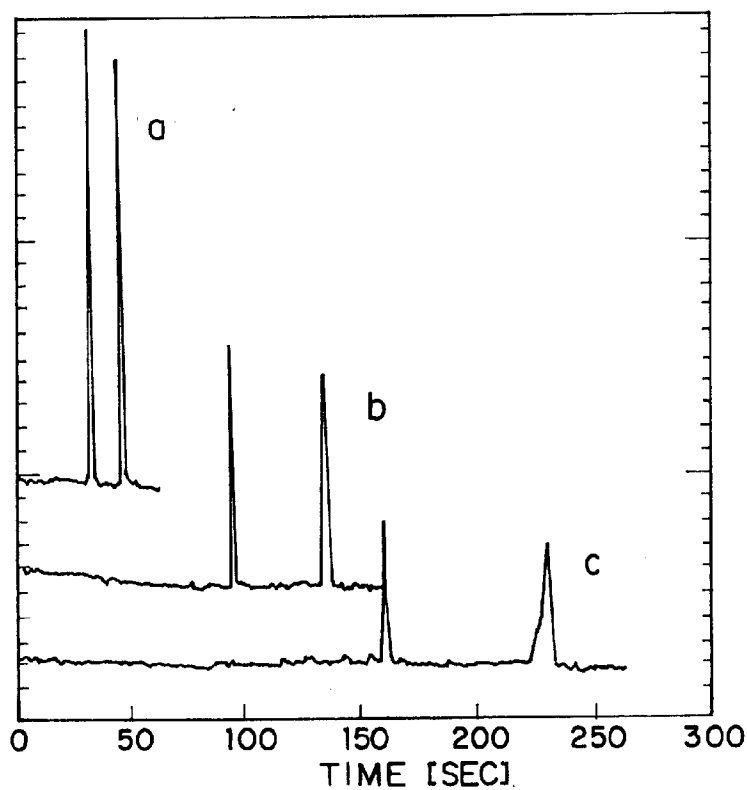
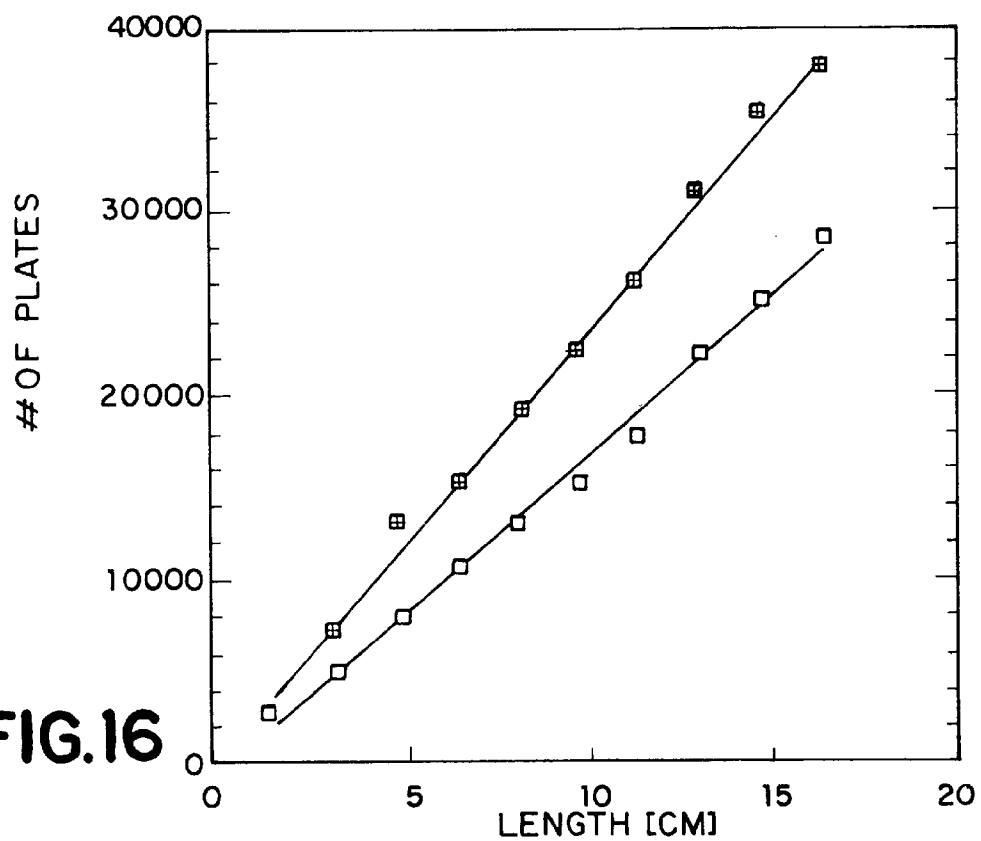
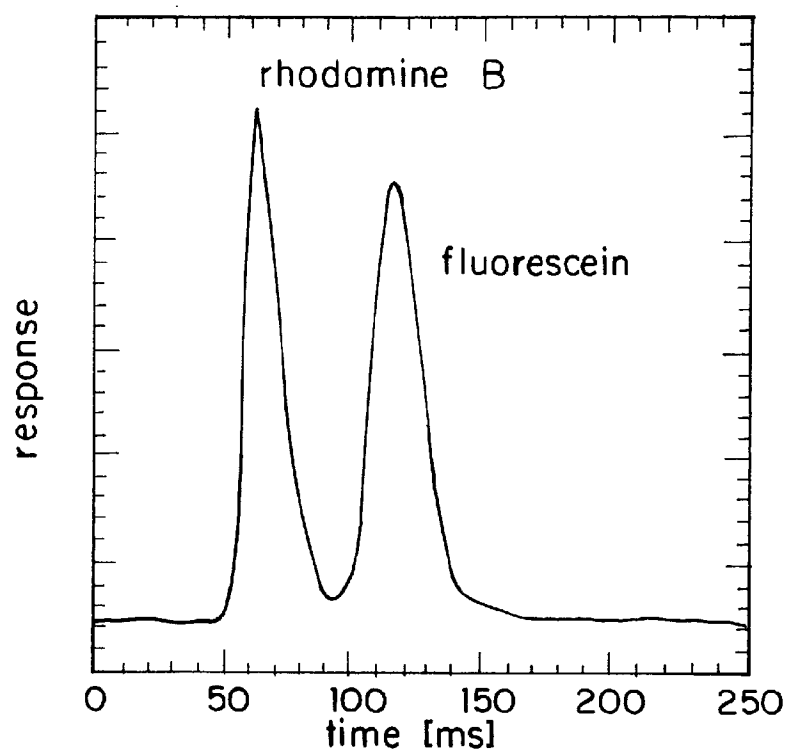
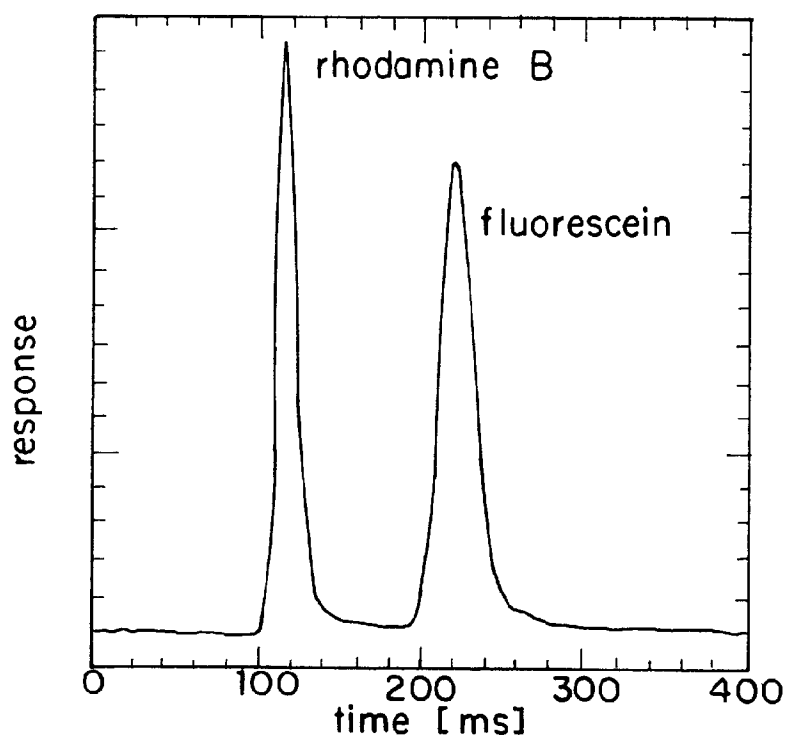
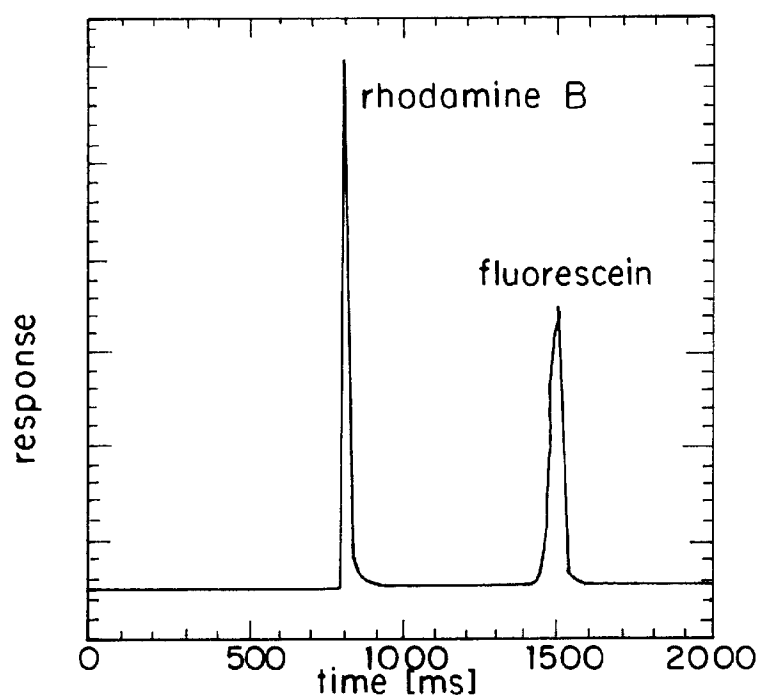
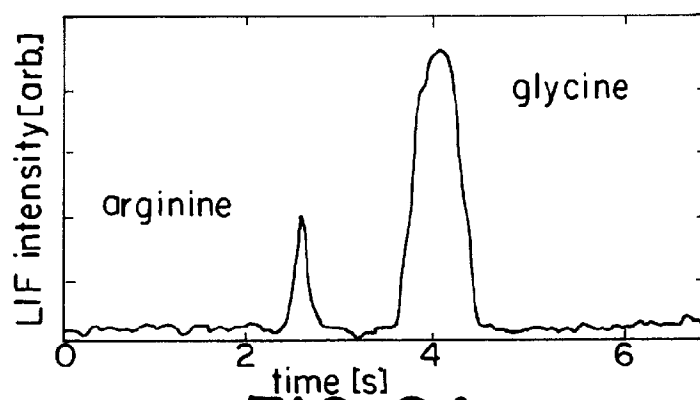
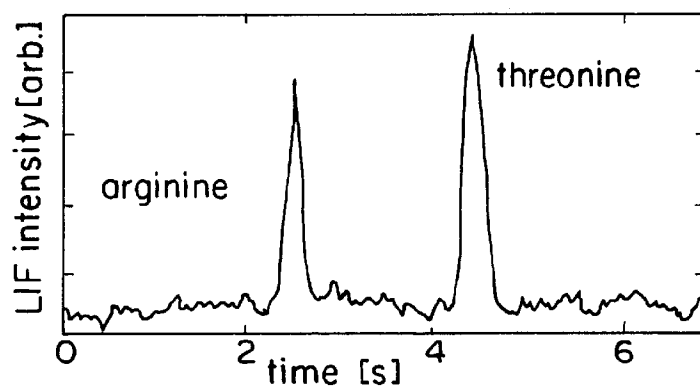
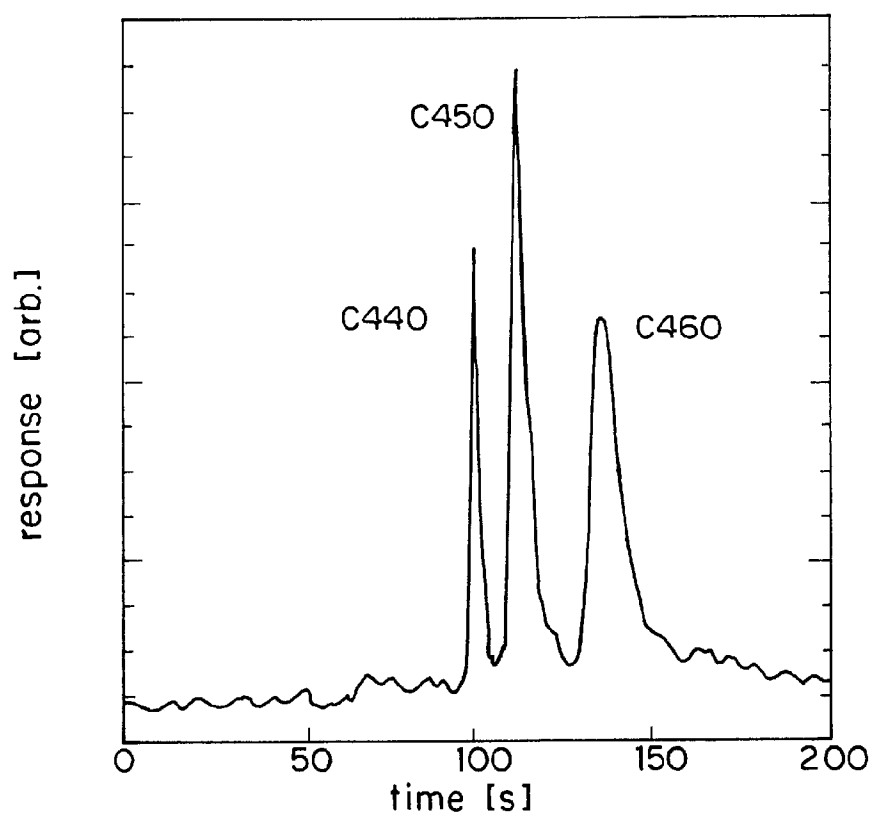
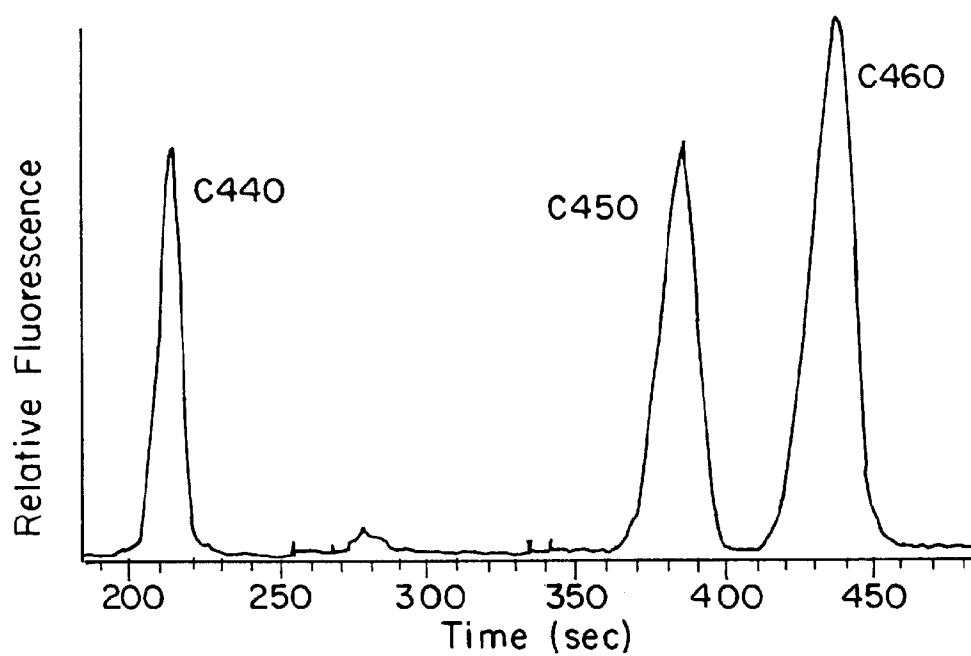


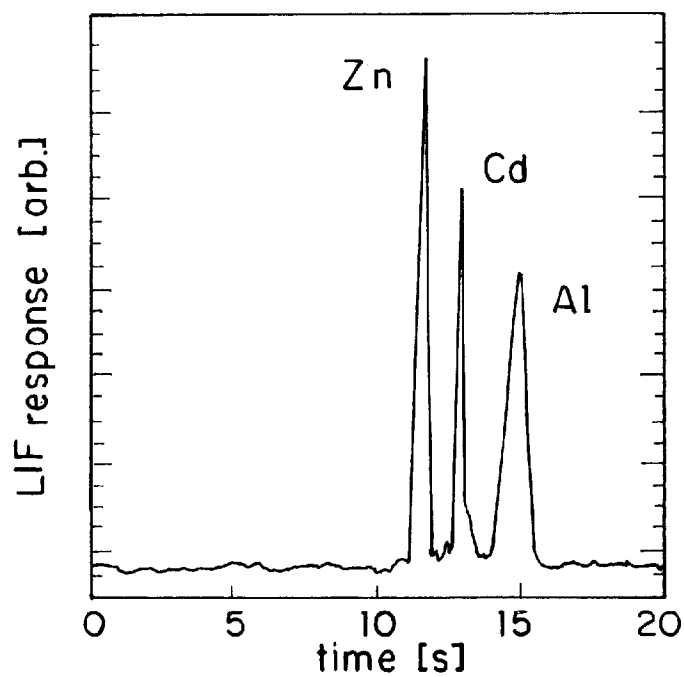
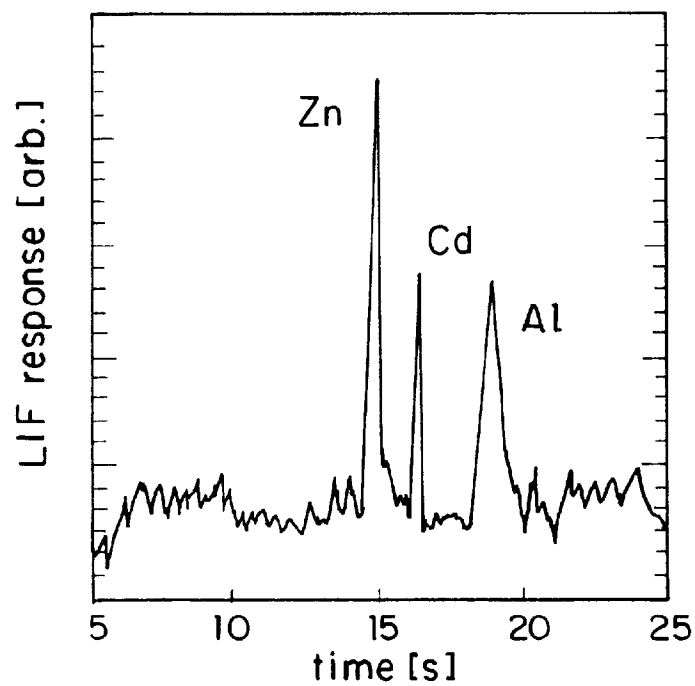
FIG.16

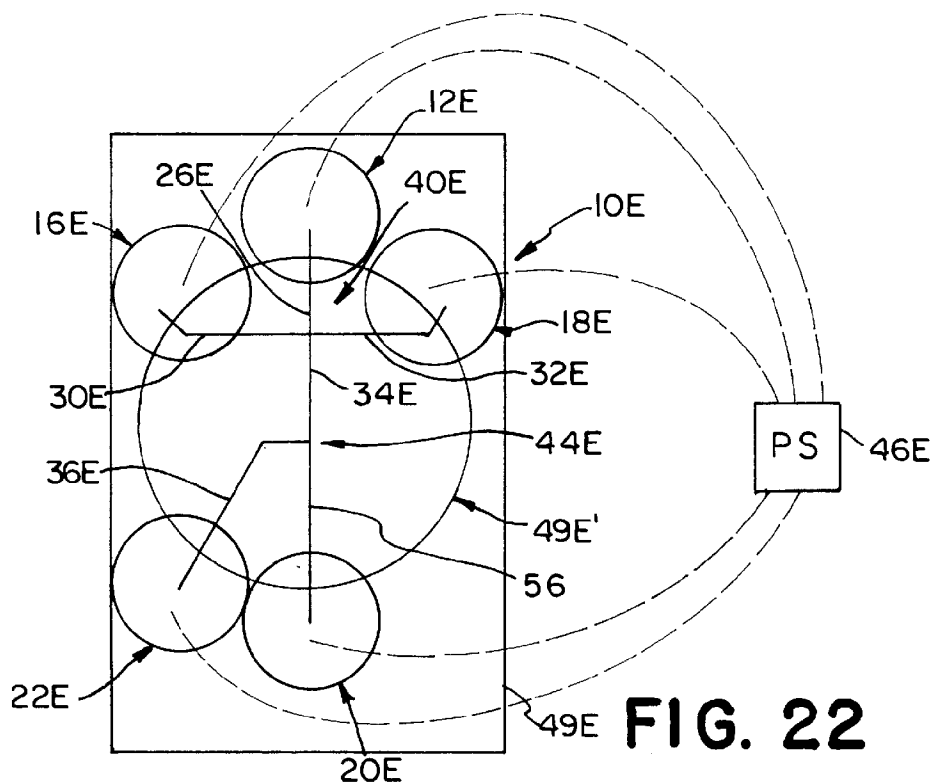
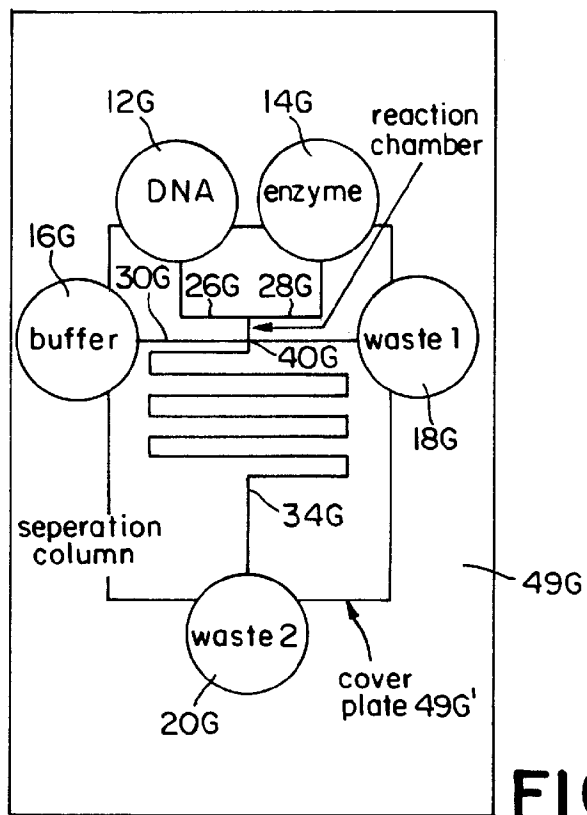


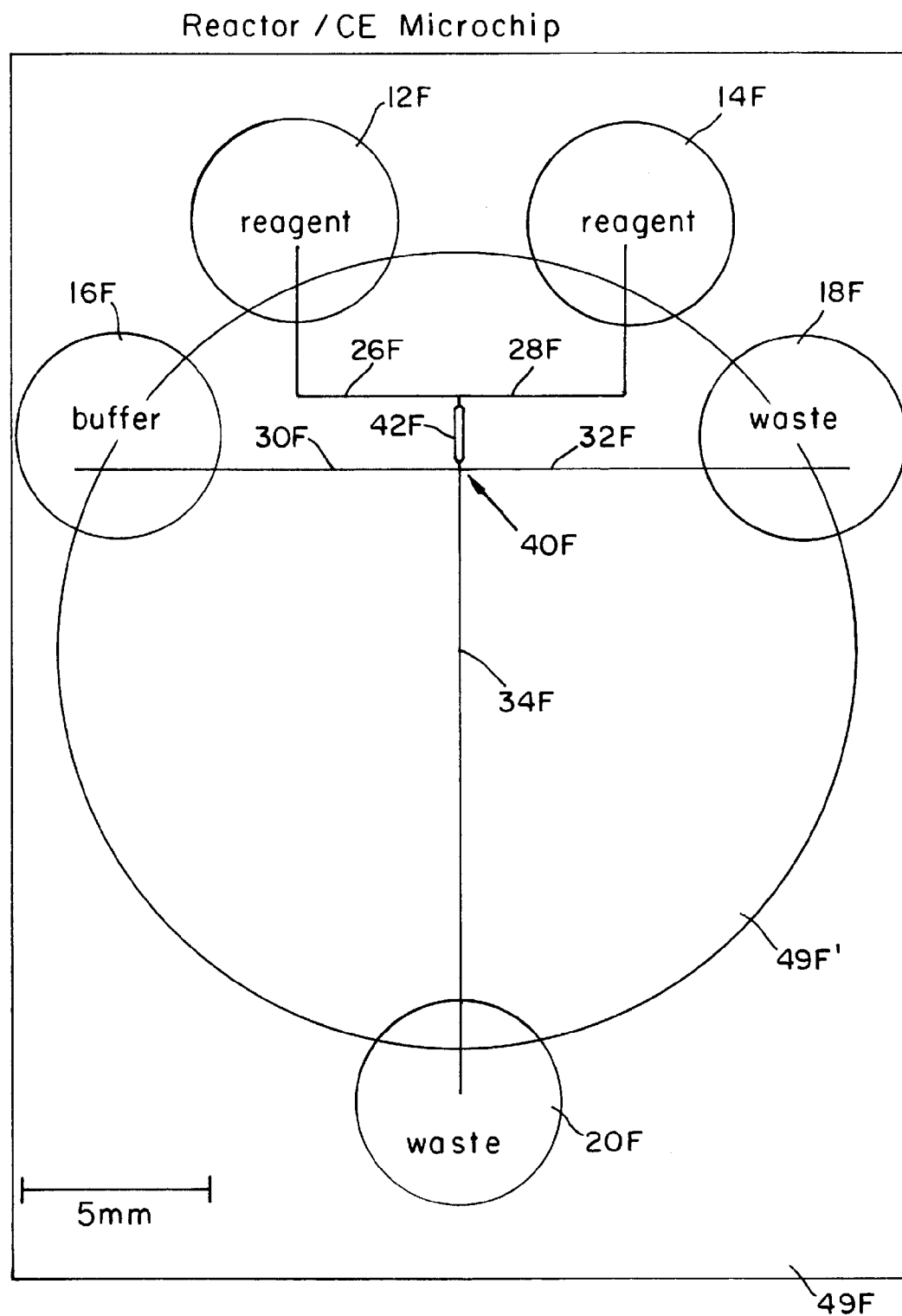
**FIG. 17a****FIG. 17b**

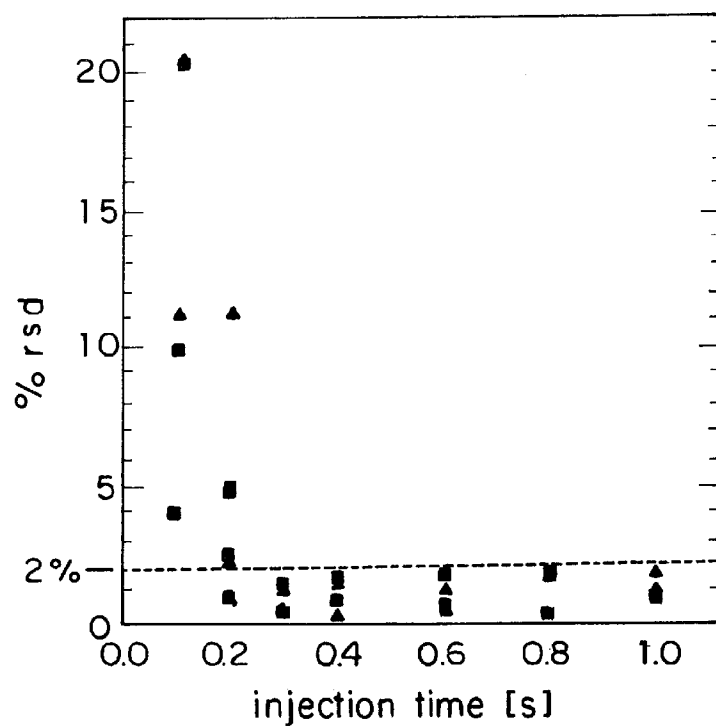
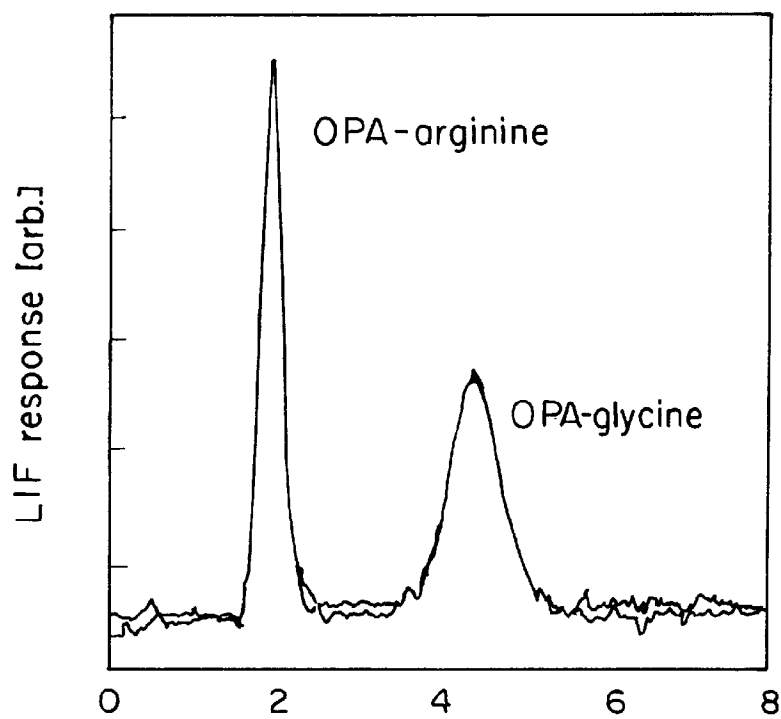
**FIG. 17c****FIG. 24a****FIG. 24b**

**FIG. 19****FIG. 20**

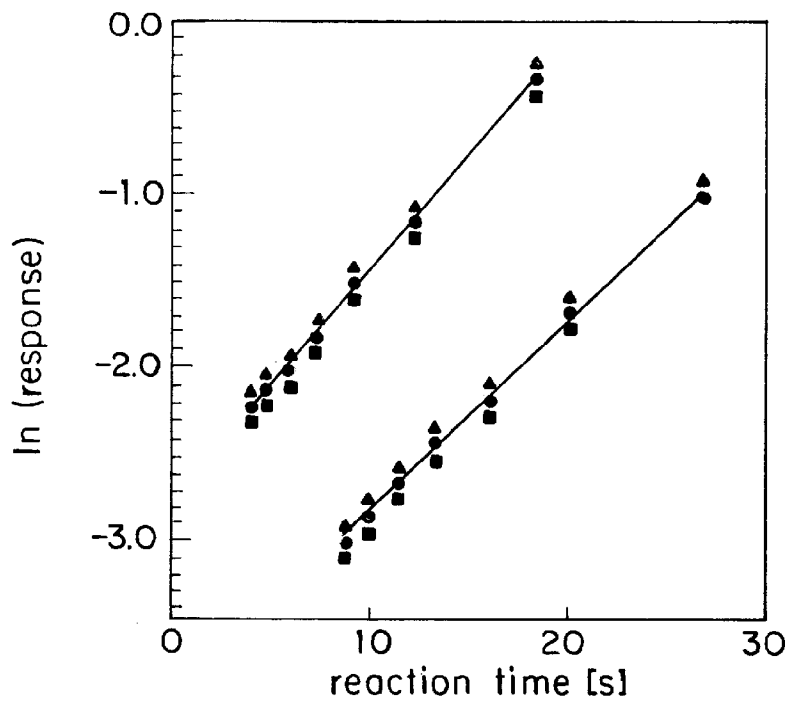
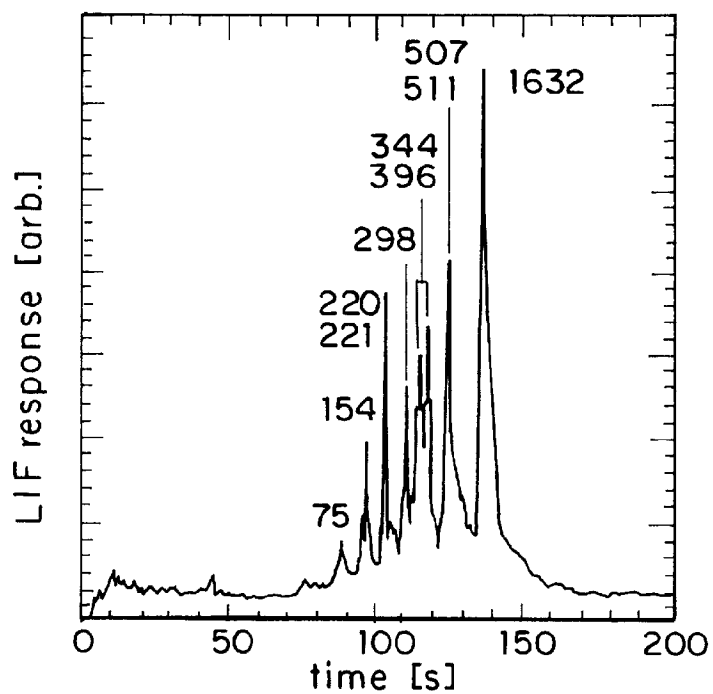
**FIG. 21a****FIG. 21b**

**FIG. 22****FIG. 30**

**FIG. 25**

**FIG. 26****FIG. 27**



**FIG. 28****FIG. 29**

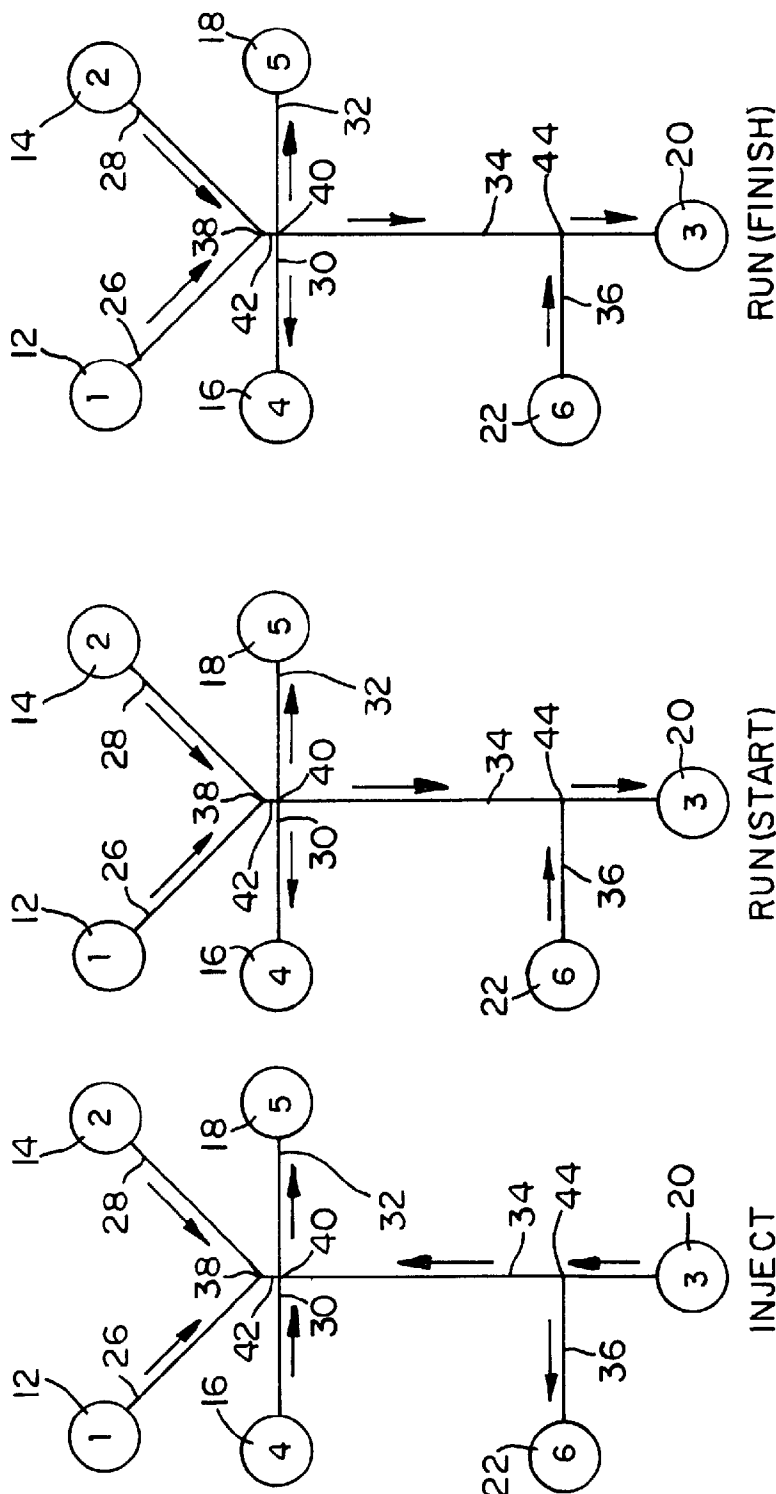


FIG. 31C

FIG. 31B

FIG. 31A

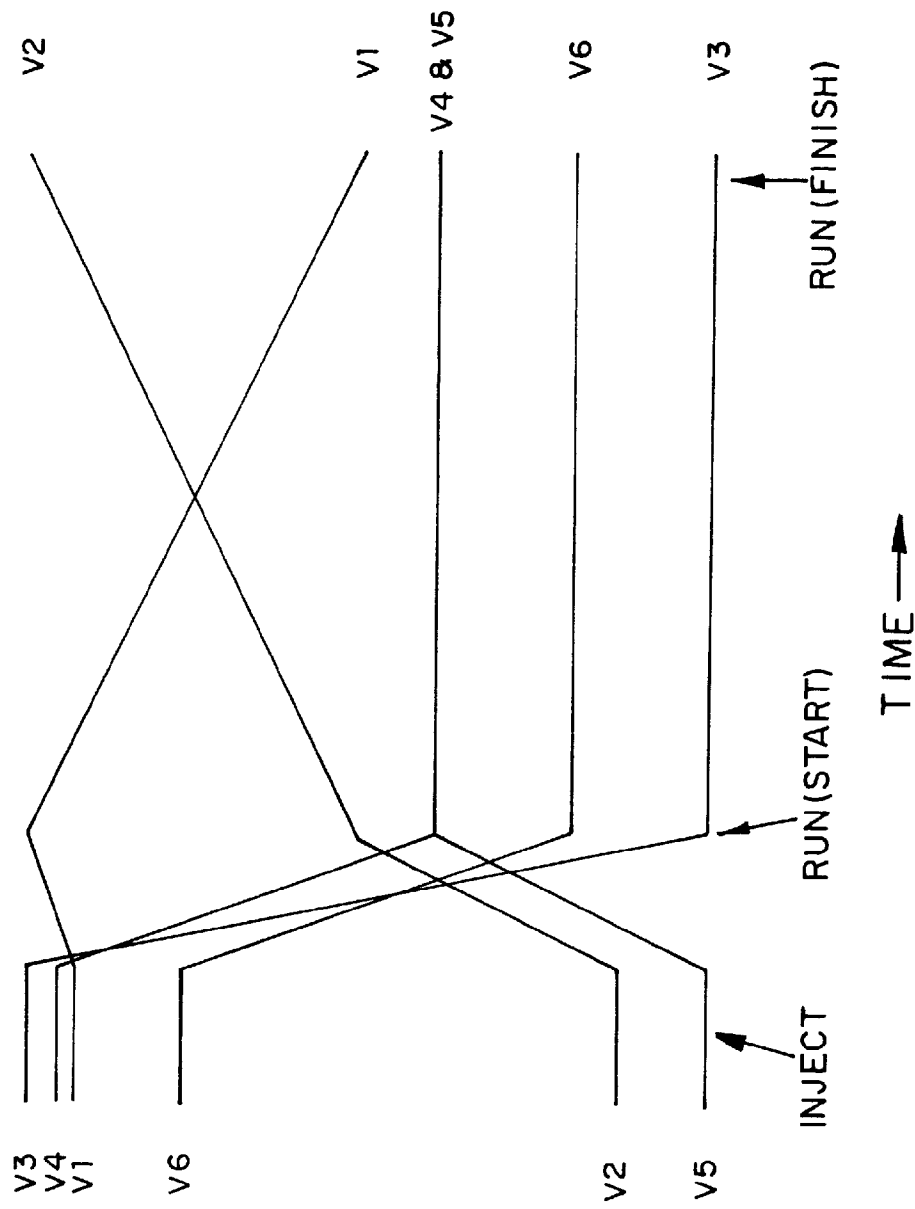


FIG. 32

# APPARATUS AND METHOD FOR PERFORMING MICROFLUIDIC MANIPULATIONS FOR CHEMICAL ANALYSIS AND SYNTHESIS

This application is a 371 of PCT/US95/09492 filed Aug. 1, 1995 and a continuation-in-part of U.S. application Ser. No. 08/283,769, filed Aug. 1, 1994.

This invention was made with Government support under contract DE-AC05-894OR21400 awarded by the U.S. Department of Energy to Martin Marietta Energy Systems, Inc. and the Government has certain rights in this invention.

## FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to miniature instrumentation for chemical analysis, chemical sensing and synthesis and, more specifically, to electrically controlled manipulations of fluids in micromachined channels. These manipulations can be used in a variety of applications, including the electrically controlled manipulation of fluid for capillary electrophoresis, liquid chromatography, flow injection analysis, and chemical reaction and synthesis.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Laboratory analysis is a cumbersome process. Acquisition of chemical and biochemical information requires expensive equipment, specialized labs and highly trained personnel. For this reason, laboratory testing is done in only a fraction of circumstances where acquisition of chemical information would be useful. A large proportion of testing in both research and clinical situations is done with crude manual methods that are characterized by high labor costs, high reagent consumption, long turnaround times, relative imprecision and poor reproducibility. The practice of techniques such as electrophoresis that are in widespread use in biology and medical laboratories have not changed significantly in thirty years.

Operations that are performed in typical laboratory processes include specimen preparation, chemical/biochemical conversions, sample fractionation, signal detection and data processing. To accomplish these tasks, liquids are often measured and dispensed with volumetric accuracy, mixed together, and subjected to one or several different physical or chemical environments that accomplish conversion or fractionation. In research, diagnostic, or development situations, these operations are carried out on a macroscopic scale using fluid volumes in the range of a few microliters to several liters at a time. Individual operations are performed in series, often using different specialized equipment and instruments for separate steps in the process. Complications, difficulty and expense are often the result of operations involving multiple laboratory processing steps.

Many workers have attempted to solve these problems by creating integrated laboratory systems. Conventional robotic devices have been adapted to perform pipetting, specimen handling, solution mixing, as well as some fractionation and detection operations. However, these devices are highly complicated, very expensive and their operation requires so much training that their use has been restricted to a relatively small number of research and development programs. More successful have been automated clinical diagnostic systems for rapidly and inexpensively performing a small number of applications such as clinical chemistry tests for blood levels of glucose, electrolytes and gases. Unfortunately due to their complexity, large size and great cost, such equipment, is limited in its application to a small number of diagnostic circumstances.

The desirability of exploiting the advantages of integrated systems in a broader context of laboratory applications has led to proposals that such systems be miniaturized. In the 1980's, considerable research and development effort was put into an exploration of the concept of biosensors with the hope they might fill the need. Such devices make use of selective chemical systems or biomolecules that are coupled to new methods of detection such as electrochemistry and optics to transduce chemical signals to electrical ones that can be interpreted by computers and other signal processing units. Unfortunately, biosensors have been a commercial disappointment. Fewer than 20 commercialized products were available in 1993, accounting for revenues in the U.S. of less than \$ 100 million. Most observers agree that this failure is primarily technological rather than reflecting a misinterpretation of market potential. In fact, many situations such as massive screening for new drugs, highly parallel genetic research and testing, micro-chemistry to minimize costly reagent consumption and waste generation, and bedside or doctor's office diagnostics would greatly benefit from miniature integrated laboratory systems.

In the early 1990's, people began to discuss the possibility of creating miniature versions of conventional technology. Andreas Manz was one of the first to articulate the idea in the scientific press. Calling them "miniaturized total analysis systems," or " $\mu$ -TAS," he predicted that it would be possible to integrate into single units microscopic versions of the various elements necessary to process chemical or biochemical samples, thereby achieving automated experimentation. Since that time, miniature components have appeared, particularly molecular separation methods and microvalves. However, attempts to combine these systems into completely integrated systems have not met with success. This is primarily because precise manipulation of tiny fluid volumes in extremely narrow channels has proven to be a difficult technological hurdle.

One prominent field susceptible to miniaturization is capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis has become a popular technique for separating charged molecular species in solution. The technique is performed in small capillary tubes to reduce band broadening effects due to thermal convection and hence improve resolving power. The small tubes imply that minute volumes of materials, on the order of nanoliters, must be handled to inject the sample into the separation capillary tube.

Current techniques for injection include electromigration and siphoning of sample from a container into a continuous separation tube. Both of these techniques suffer from relatively poor reproducibility, and electromigration additionally suffers from electrophoretic mobility-based bias. For both sampling techniques the input end of the analysis capillary tube must be transferred from a buffer reservoir to a reservoir holding the sample. Thus, a mechanical manipulation is involved. For the siphoning injection, the sample reservoir is raised above the buffer reservoir holding the exit end of the capillary for a fixed length of time.

An electromigration injection is effected by applying an appropriately polarized electrical potential across the capillary tube for a given duration while the entrance end of the capillary is in the sample reservoir. This can lead to sampling bias because a disproportionately larger quantity of the species with higher electrophoretic mobilities migrate into the tube. The capillary is removed from the sample reservoir and replaced into the entrance buffer reservoir after the injection duration for both techniques.

A continuing need exists for methods and apparatuses which lead to improved electrophoretic resolution and improved injection stability.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides microchip laboratory systems and methods that allow complex biochemical and chemical procedures to be conducted on a microchip under electronic control. The microchip laboratory systems comprises a material handling apparatus that transports materials through a systems of interconnected, integrated channels on a microchip. The movement of the materials is precisely directed by controlling the electric fields produced in the integrated channels. The precise control of the movement of such materials enables precise mixing, separation, and reaction as needed to implement a desired biochemical or chemical procedure.

The microchip laboratory system of the present invention analyzes and/or synthesizes chemical materials in a precise and reproducible manner. The system includes a body having integrated channels connecting a plurality of reservoirs that store the chemical materials used in the chemical analysis or synthesis performed by the system. In one aspect, at least five of the reservoirs simultaneously have a controlled electrical potential, such that material from at least one of the reservoirs is transported through the channels toward at least one of the other reservoirs. The transportation of the material through the channels provides exposure to one or more selected chemical or physical environments, thereby resulting in the synthesis or analysis of the chemical material.

The microchip laboratory system preferably also includes one or more intersections of integrated channels connecting three or more of the reservoirs. The laboratory system controls the electric fields produced in the channels in a manner that controls which materials in the reservoirs are transported through the intersection(s). In one embodiment, the microchip laboratory system acts as a mixer or diluter that combines materials in the intersection(s) by producing an electrical potential in the intersection that is less than the electrical potential at each of the two reservoirs from which the materials to be mixed originate. Alternatively, the laboratory system can act as a dispenser that electrokinetically injects precise, controlled amounts of material through the intersection(s).

By simultaneously applying an electrical potential at each of at least five reservoirs, the microchip laboratory system can act as a complete system for performing an entire chemical analysis or synthesis. The five or more reservoirs can be configured in a manner that enables the electrokinetic separation of a sample to be analyzed ("the analyte") which is then mixed with a reagent from a reagent reservoir. Alternatively, a chemical reaction of an analyte and a solvent can be performed first, and then the material resulting from the reaction can be electrokinetically separated. As such, the use of five or more reservoirs provides an integrated laboratory system that can perform virtually any chemical analysis or synthesis.

In yet another aspect of the invention, the microchip laboratory system includes a double intersection formed by channels interconnecting at least six reservoirs. The first intersection can be used to inject a precisely sized analyte plug into a separation channel toward a waste reservoir. The electrical potential at the second intersection can be selected in a manner that provides additional control over the size of the analyte plug. In addition, the electrical potentials can be controlled in a manner that transports materials from the fifth and sixth reservoirs through the second intersection toward the first intersection and toward the fourth reservoir after a selected volume of material from the first intersection

is transported through the second intersection toward the fourth reservoir. Such control can be used to push the analyte plug further down the separation channel while enabling a second analyte plug to be injected through the first intersection.

In another aspect, the microchip laboratory system acts as a microchip flow control system to control the flow of material through an intersection formed by integrated channels connecting at least four reservoirs. The microchip flow control system simultaneously applies a controlled electrical potential to at least three of the reservoirs such that the volume of material transported from the first reservoir to a second reservoir through the intersection is selectively controlled solely by the movement of a material from a third reservoir through the intersection. Preferably, the material moved through the third reservoir to selectively control the material transported from the first reservoir is directed toward the same second reservoir as the material from the first reservoir. As such, the microchip flow control system acts as a valve or a gate that selectively controls the volume of material transported through the intersection. The microchip flow control system can also be configured to act as a dispenser that prevents the first material from moving through the intersection toward the second reservoir after a selected volume of the first material has passed through the intersection. Alternatively, the microchip flow control system can be configured to act as a diluter that mixes the first and second materials in the intersection in a manner that simultaneously transports the first and second materials from the intersection toward the second reservoir.

Other objects, advantages and salient features of the invention will become apparent from the following detailed description, which taken in conjunction with the annexed drawings, discloses preferred embodiments of the invention

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a schematic view of a preferred embodiment of the present invention;

FIG. 2 is an enlarged, vertical sectional view of a channel shown;

FIG. 3 is a schematic, top view of a microchip according to a second preferred embodiment of the present invention;

FIG. 4 is an enlarged view of the intersection region of FIG. 3;

FIG. 5 are CCD images of a plug of analyte moving through the intersection of the FIG. 3 embodiment,

FIG. 6 is a schematic top view of a microchip laboratory system according to a third preferred embodiment of a microchip according to the present invention;

FIG. 7 is a CCD image of "sample loading mode for rhodamine B" (shaded area);

FIG. 8(a) is a schematic view of the intersection area of the microchip of FIG. 6, prior to analyte injection;

FIG. 8(b) is a CCD fluorescence image taken of the same area depicted in FIG. 8(a), after sample loading in the pinched mode;

FIG. 8(c) is a photomicrograph taken of the same area depicted in FIG. 8(a), after sample loading in the floating mode;

FIG. 9 shows integrated fluorescence signals for injected volume plotted versus time for pinched and floating injections;

FIG. 10 is a schematic, top view of a microchip according to a fourth preferred embodiment of the present invention;

FIG. 11 is an enlarged view of the intersection region of FIG. 10;

FIG. 12 is a schematic top view of a microchip laboratory system according to a fifth preferred embodiment according to the present invention;

FIG. 13(a) is a schematic view of a CCD camera view of the intersection area of the microchip laboratory system of FIG. 12;

FIG. 13(b) is a CCD fluorescence image taken of the same area depicted in FIG. 13(a), after sample loading in the pinched mode;

FIGS. 13(c)–13(e) are CCD fluorescence images taken of the same area depicted in FIG. 13(a), sequentially showing a plug of analyte moving away from the channel intersection at 1, 2, and 3 seconds, respectively, after switching to the run mode;

FIG. 14 shows two injection profiles for didansyl-lysine injected for 2s with  $\gamma$  equal to 0.97 and 9.7;

FIG. 15 are electropherograms taken at (a) 3.3 cm, (b) 9.9 cm, and (c) 16.5 cm from the point of injection for rhodamine B (less retained) and sulforhodamine (more retained);

FIG. 16 is a plot of the efficiency data generated from the electropherograms of FIG. 15, showing variation of the plate number with channel length for rhodamine B (square with plus) and sulforhodamine (square with plus) and sulforhodamine (square with dot) with best linear fit (solid lines) for each analyte;

FIG. 17(a) is an electropherogram of rhodamine B and fluorescein with a separation field strength of 1.5 kV/cm and a separation length of 0.9 mm;

FIG. 17(b) is an electropherogram of rhodamine B and fluorescein with a separation field strength of 1.5 kV/cm and a separation length of 1.6 mm;

FIG. 17(c) is an electropherogram of rhodamine B and fluorescein with a separation field strength of 1.5 kV/cm and a separation length of 11.1 mm;

FIG. 18 is a graph showing variation of the number of plates per unit time as a function of the electric field strength for rhodamine B at separation lengths of 1.6 mm (circle) and 11.1 mm (square) and for fluorescein at separation lengths of 1.6 mm (diamond) and 11.1 mm (triangle);

FIG. 19 shows a chromatogram of coumarins analyzed by electrochromatography using the system of FIG. 12;

FIG. 20 shows a chromatogram of coumarins resulting from micellar electrokinetic capillary chromatography using the system of FIG. 12;

FIGS. 21(a) and 21(b) show the separation of three metal ions using the system of FIG. 12;

FIG. 22 is a schematic, top plan view of a microchip according to the FIG. 3 embodiment, additionally including a reagent reservoir and reaction channel;

FIG. 23 is a schematic view of the embodiment of FIG. 20, showing applied voltages;

FIG. 24 shows two electropherograms produced using the FIG. 22 embodiment;

FIG. 25 is a schematic view of a microchip laboratory system according to a sixth preferred embodiment of the present invention;

FIG. 26 shows the reproducibility of the amount injected for arginine and glycine using the system of FIG. 25;

FIG. 27 shows the overlay of three electrophoretic separations using the system of FIG. 25;

FIG. 28 shows a plot of amounts injected versus reaction time using the system of FIG. 25;

FIG. 29 shows an electropherogram of restriction fragments produced using the system of FIG. 25;

FIG. 30 is a schematic view of a microchip laboratory system according to a seventh preferred embodiment of the present invention.

FIG. 31 is a schematic view of the apparatus of FIG. 21, showing sequential applications of voltages to effect desired fluidic manipulations; and

FIG. 32 is a graph showing the different voltages applied to effect the fluidic manipulations of FIG. 23.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Integrated, micro-laboratory systems for analyzing or synthesizing chemicals require a precise way of manipulating fluids and fluid-borne material and subjecting the fluids to selected chemical or physical environments that produce desired conversions or partitioning. Given the concentration of analytes that produces chemical conversion in reasonable time scales, the nature of molecular detection, diffusion times and manufacturing methods for creating devices on a microscopic scale, miniature integrated micro-laboratory systems lend themselves to channels having dimensions on the order of 1 to 100 micrometers in diameter. Within this context, electrokinetic pumping has proven to be versatile and effective in transporting materials in microfabricated laboratory systems.

The present invention provides the tools necessary to make use of electrokinetic pumping not only in separations, but also to perform liquid handling that accomplishes other important sample processing steps, such as chemical conversions or sample partitioning. By simultaneously controlling voltage at a plurality of ports connected by channels in a microchip structure, it is possible to measure and dispense fluids with great precision, mix reagents, incubate reaction components, direct the components towards sites of physical or biochemical partition and subject the components to detector systems. By combining these capabilities on a single microchip, one is able to create complete, miniature, integrated automated laboratory systems for analyzing or synthesizing chemicals.

Such integrated micro-laboratory systems can be made up of several component elements. Component elements can include liquid dispensing systems, liquid mixing systems, molecular partition systems, detector sights, etc. For example, as described herein, one can construct a relatively complete system for the identification of restriction endonuclease sites in a DNA molecule. This single microfabricated device thus includes in a single system the functions that are traditionally performed by a technician employing pipettors, incubators, gel electrophoresis systems, and data acquisition systems. In this system, DNA is mixed with an enzyme, the mixture is incubated, and a selected volume of the reaction mixture is dispensed into a separation channel. Electrophoresis is conducted concurrent with fluorescent labeling of the DNA.

Shown in FIG. 1 is an example of a microchip laboratory system 10 configured to implement an entire chemical analysis or synthesis. The laboratory system includes six reservoirs 12, 14, 16, 18, 20, and 22 connected to each other by a system of channels 24 micromachined into a substrate or base member (not shown in FIG. 1), as discussed in more detail below. Each reservoir 12–22 is in fluid communication with a corresponding channel 26, 28, 30, 32, 34, 36, and 38

of the channel system **24**. The first channel **26** leading from the first reservoir **12** is connected to the second channel **28** leading from the second reservoir **14** at a first intersection **38**. Likewise, the third channel **30** from the third reservoir **16** is connected to the fourth channel **32** at a second intersection **40**. The first intersection **38** is connected to the second intersection **40** by a reaction chamber or channel **42**. The fifth channel **34** from the fifth reservoir **20** is also connected to the second intersection **40** such that the second intersection **40** is a four-way intersection of channels **30**, **32**, **34**, and **42**. The fifth channel **34** also intersects the sixth channel **36** from the sixth reservoir **22** at a third intersection **44**.

The materials stored in the reservoirs preferably are transported electrokinetically through the channel system **24** in order to implement the desired analysis or synthesis. To provide such electrokinetic transport, the laboratory system **10** includes a voltage controller **46** capable of applying selectable voltage levels, including ground. Such a voltage controller can be implemented using multiple voltage dividers and multiple relays to obtain the selectable voltage levels. The voltage controller is connected to an electrode positioned in each of the six reservoirs **12–22** by voltage lines **V1–V6** in order to apply the desired voltages to the materials in the reservoirs. Preferably, the voltage controller also includes sensor channels **S1**, **S2**, and **S3** connected to the first, second, and third intersections **38**, **40**, **44**, respectively, in order to sense the voltages present at those intersections.

The use of electrokinetic transport on microminaturized planar liquid phase separation devices, described above, is a viable approach for sample manipulation and as a pumping mechanism for liquid chromatography. The present invention also entails the use of electroosmotic flow to mix various fluids in a controlled and reproducible fashion. When an appropriate fluid is placed in a tube made of a correspondingly appropriate material, functional groups at the surface of the tube can ionize. In the case of tubing materials that are terminated in hydroxyl groups, protons will leave the surface and enter an aqueous solvent. Under such conditions the surface will have a net negative charge and the solvent will have an excess of positive charges, mostly in the charged double layer at the surface. With the application of an electric field across the tube, the excess cations in solution will be attracted to the cathode, or negative electrode. The movement of these positive charges through the tube will drag the solvent with them. The steady state velocity is given by equation 1,

$$v = \frac{\epsilon \xi E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

where  $v$  is the solvent velocity,  $\epsilon$  is the dielectric constant of the fluid,  $\xi$  is the zeta potential of the surface,  $E$  is the electric field strength, and  $\eta$  is the solvent viscosity. From equation 1 it is obvious that the fluid flow velocity or flow rate can be controlled through the electric field strength. Thus, electroosmosis can be used as a programmable pumping mechanism.

The laboratory microchip system **10** shown in FIG. 1 could be used for performing numerous types of laboratory analysis or synthesis, such as DNA sequencing or analysis, electrochromatography, micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC), inorganic ion analysis, and gradient elution liquid chromatography, as discussed in more detail below. The fifth channel **34** typically is used for electrophoretic or electrochromatographic separations and thus may be referred to in certain embodiments as a separation channel or column. The reaction chamber **42** can be

used to mix any two chemicals stored in the first and second reservoirs **12**, **14**. For example, DNA from the first reservoir **12** could be mixed with an enzyme from the second reservoir **14** in the first intersection **38** and the mixture could be incubated in the reaction chamber **42**. The incubated mixture could then be transported through the second intersection **40** into the separation column **34** for separation. The sixth reservoir **22** can be used to store a fluorescent label that is mixed in the third intersection **44** with the materials separated in the separation column **34**. An appropriate detector (**D**) could then be employed to analyze the labeled materials between the third intersection **44** and the fifth reservoir **20**. By providing for a pre-separation column reaction in the first intersection **38** and reaction chamber **42** and a post-separation column reaction in the third intersection **44**, the laboratory system **10** can be used to implement many standard laboratory techniques normally implemented manually in a conventional laboratory. In addition, the elements of the laboratory system **10** could be used to build a more complex system to solve more complex laboratory procedures.

The laboratory microchip system **10** includes a substrate or base member (not shown in FIG. 1) which can be an approximately two inch by one inch piece of microscope slide (Corning, Inc. #2947). While glass is a preferred material, other similar materials may be used, such as fused silica, crystalline quartz, fused quartz, plastics, and silicon (if the surface is treated sufficiently to alter its resistivity). Preferably, a non-conductive material such as glass or fused quartz is used to allow relatively high electric fields to be applied to electrokinetically transport materials through channels in the microchip. Semiconducting materials such as silicon could also be used, but the electric field applied would normally need to be kept to a minimum (approximately less than 300 volts per centimeter using present techniques of providing insulating layers), which may provide insufficient electrokinetic movement.

The channel pattern **24** is formed in a planar surface of the substrate using standard photolithographic procedures followed by chemical wet etching. The channel pattern may be transferred onto the substrate with a positive photoresist (Shipley 1811) and an e-beam written chrome mask (Institute of Advanced Manufacturing Sciences, Inc.). The pattern may be chemically etched using  $\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}$  solution.

After forming the channel pattern, a cover plate may then be bonded to the substrate using a direct bonding technique whereby the substrate and the cover plate surfaces are first hydrolyzed in a dilute  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$  solution and then joined. The assembly is then annealed at about  $500^\circ\text{C}$ . in order to insure proper adhesion of the cover plate to the substrate.

Following bonding of the cover plate, the reservoirs are affixed to the substrate, with portions of the cover plate sandwiched therebetween, using epoxy or other suitable means. The reservoirs can be cylindrical with open opposite axial ends. Typically, electrical contact is made by placing a platinum wire electrode in each reservoirs. The electrodes are connected to a voltage controller **46** which applies a desired potential to select electrodes, in a manner described in more detail below.

A cross section of the first channel is shown in FIG. 2 and is identical to the cross section of each of the other integrated channels. When using a non-crystalline material (such as glass) for the substrate, and when the channels are chemically wet etched, an isotropic etch occurs, i.e., the glass etches uniformly in all directions, and the resulting channel geometry is trapezoidal. The trapezoidal cross section is due to "undercutting" by the chemical etching process at the

edge of the photoresist. In one embodiment, the channel cross section of the illustrated embodiment has dimensions of 5.2  $\mu\text{m}$  in depth, 57.82  $\mu\text{m}$  in width at the top and 45.82  $\mu\text{m}$  in width at the bottom. In another embodiment, the channel has a depth "d" of 10.82  $\mu\text{m}$ , an upper width "w1" of 90  $\mu\text{m}$ , and a lower width "w2" of 70  $\mu\text{m}$ .

An important aspect of the present invention is the controlled electrokinetic transportation of materials through the channel system 24. Such controlled electrokinetic transport can be used to dispense a selected amount of material from one of the reservoirs through one or more intersections of the channel structure 24. Alternatively, as noted above, selected amounts of materials from two reservoirs can be transported to an intersection where the materials can be mixed in desired concentrations.

#### Gated Dispenser

Shown in FIG. 3 is a laboratory component 10A that can be used to implement a preferred method of transporting materials through a channel structure 24A. The A following each number in FIG. 3 indicates that it corresponds to an analogous element of FIG. 1 of the same number without the A. For simplicity, the electrodes and the connections to the voltage controller that controls the transport of materials through the channel System 24A are not shown in FIG. 3.

The microchip laboratory system 10A shown in FIG. 3 controls the amount of material from the first reservoir 12A transported through the intersection 40A toward the fourth reservoir 20A by electrokinetically opening and closing access to the intersection 40A from the first channel 26A. As such, the laboratory microchip system 10A essentially implements a controlled electrokinetic valve. Such an electrokinetic valve can be used as a dispenser to dispense selected volumes of a single material or as a mixer to mix selected volumes of plural materials in the intersection 40A. In general, electro-osmosis is used to transport "fluid materials" and electrophoresis is used to transport ions without transporting the fluid material surrounding the ions. Accordingly, as used herein, the term "material" is used broadly to cover any form of material, including fluids and ions.

The laboratory system 10A provides a continuous unidirectional flow of fluid through the separation channel 34A. This injection or dispensing scheme only requires that the voltage be changed or removed from one (or two) reservoirs and allows the fourth reservoir 20A to remain at ground potential. This will allow injection and separation to be performed with a single polarity power supply.

An enlarged view of the intersection 40A is shown in FIG. 4. The directional arrows indicate the time sequence of the flow profiles at the intersection 40A. The solid arrows show the initial flow pattern. Voltages at the various reservoirs are adjusted to obtain the described flow patterns. The initial flow pattern brings a second material from the second reservoir 16A at a sufficient rate such that all of the first material transported from reservoir 12A to the intersection 40A is pushed toward the third reservoir 18A. In general, the potential distribution will be such that the highest potential is in the second reservoir 16A, a slightly lower potential in the first reservoir 12A, and yet a lower potential in the third reservoir 18A, with the fourth reservoir 20A being grounded. Under these conditions, the flow towards the fourth reservoir 20A is solely the second material from the second reservoir 16A.

To dispense material from the first reservoir 12A through the intersection 40A, the potential at the second reservoir 16A can be switched to a value less than the potential of the first reservoir 12A or the potentials at reservoirs 16A and/or

18A, can be floated momentarily to provide the flow shown by the short dashed arrows in FIG. 4. Under these conditions, the primary flow will be from the first reservoir 12A down towards the separation channel waste reservoir 20A. The flow from the second and third reservoirs 16A, 18A will be small and could be in either direction. This condition is held long enough to transport a desired amount of material from the first reservoir 12A through the intersection 40A and into the separation channel 34A. After sufficient time for the desired material to pass through the intersection 40A, the voltage distribution is switched back to the original values to prevent additional material from the first reservoir 12A from flowing through the intersection 40A toward the separation channel 34A.

One application of such a "gated dispenser" is to inject a controlled, variable-sized plug of analyte from the first reservoir 12A for electrophoretic or chromatographic separation in the separation channel 34A. In such a system, the first reservoir 12A stores analyte, the second reservoir 16A stores an ionic buffer, the third reservoir 18A is a first waste reservoir and the fourth reservoir 20A is a second waste reservoir. To inject a small variable plug of analyte from the first reservoir 12A, the potentials at the buffer and first waste reservoirs 16A, 18A are simply floated for a short period of time ( $\approx 100$  ms) to allow the analyte to migrate down the separation column 34A. To break off the injection plug, the potentials at the buffer reservoir 16A and the first waste reservoir 18A are reapplied. Alternatively, the valving sequence could be effected by bringing reservoirs 16A and 18A to the potential of the intersection 40A and then returning them to their original potentials. A shortfall of this method is that the composition of the injected plug has an electrophoretic mobility bias whereby the faster migrating compounds are introduced preferentially into the separation column 34A over slower migrating compounds.

In FIG. 5, a sequential view of a plug of analyte moving through the intersection of the FIG. 3 embodiment can be seen by CCD images. The analyte being pumped through the laboratory system 10A was rhodamine B (shaded area), and the orientation of the CCD images of the injection cross or intersection is the same as in FIG. 3. The first image, (A), shows the analyte being pumped through the injection cross or intersection toward the first waste reservoir 18A prior to the injection. The second image, (B), shows the analyte plug being injected into the separation column 34A. The third image, (C), depicts the analyte plug moving away from the injection intersection after an injection plug has been completely introduced into the separation column 34A. The potentials at the buffer and first waste reservoirs 16A, 18A were floated for 100 ms while the sample moved into the separation column 34A. By the time of the (C) image, the closed gate mode has resumed to stop further analyte from moving through the intersection 40A into the separation column 34A, and a clean injection plug with a length of 142  $\mu\text{m}$  has been introduced into the separation column. As discussed below, the gated injector contributes to only a minor fraction of the total plate height. The injection plug length (volume) is a function of the time of the injection and the electric field strength in the column. The shape of the injected plug is skewed slightly because of the directionality of the cleaving buffer flow. However, for a given injection period, the reproducibility of the amount injected, determined by integrating the peak area, is 1% RSD for a series of 10 replicate injections.

Electrophoresis experiments were conducted using the microchip laboratory system 10A of FIG. 3, and employed methodology according to the present invention. Chip



dynamics were analyzed using analyte fluorescence. A charge coupled device (CCD) camera was used to monitor designated areas of the chip and a photomultiplier tube (PMT) tracked single point events. The CCD (Princeton Instruments, Inc. TE/CCD-512TKM camera was mounted on a stereo microscope (Nikon SMZ-U), and the laboratory system **10A** was illuminated using an argon ion laser (514.5 nm, Coherent Innova 90) operating at 3 W with the beam expanded to a circular spot  $\approx 2$  cm in diameter. The PMT, with collection optics, was situated below the microchip with the optical axis perpendicular to the microchip surface. The laser was operated at approximately 20 mW, and the beam impinged upon the microchip at a  $45^\circ$  angle from the microchip surface and parallel to the separation channel. The laser beam and PMT observation axis were separated by a  $135^\circ$  angle. The point detection scheme employed a helium-neon laser (543 nm, PMS Electro-optics LHGP-0051) with an electrometer (Keithley 617) to monitor response of the PMT (Oriol 77340). The voltage controller **46** (Spellman CZE 1000R) for electrophoresis was operated between 0 and +4.4 kV relative to ground.

The type of gated injector described with respect to FIGS. **3** and **4** show electrophoretic mobility based bias as do conventional electroosmotic injections. Nonetheless, this approach has simplicity in voltage switching requirements and fabrication and provides continuous unidirectional flow through the separation channel. In addition, the gated injector provides a method for valving a variable volume of fluid into the separation channel **34A** in a manner that is precisely controlled by the electrical potentials applied.

Another application of the gated dispenser **10A** is to dilute or mix desired quantities of materials in a controlled manner. To implement such a mixing scheme in order to mix the materials from the first and second reservoirs **12A**, **16A**, the potentials in the first and second channels **26A**, **30A** need to be maintained higher than the potential of the intersection **40A** during mixing. Such potentials will cause the materials from the first and second reservoirs **12A** and **16A** to simultaneously move through the intersection **40A** and thereby mix the two materials. The potentials applied at the first and second reservoirs **12A**, **16A** can be adjusted as desired to achieve the selected concentration of each material. After dispensing the desired amounts of each material the potential at the second reservoir **16A** may be increased in a manner sufficient to prevent further material from the first reservoir **12A** from being transported through the intersection **40A** toward the third reservoir **30A**.

#### Analyte Injector

Shown in FIG. **6** is a microchip analyte injector **10B** according to the present invention. The channel pattern **24B** has four distinct channels **26B**, **30B**, **32B**, and **34B** micromachined into a substrate **49** as discussed above. Each channel has an accompanying reservoir mounted above the terminus of each channel portion, and all four channels intersect at one end in a four way intersection **40B**. The opposite ends of each section provide termini that extend just beyond the peripheral edge of a cover plate **49'** mounted on the substrate **49**. The analyte injector **10B** shown in FIG. **6** is substantially identical to the gated dispenser **10A** except that the electrical potentials are applied in a manner that injects a volume of material from reservoir **16B** through the intersection **40B** rather than from the reservoir **12B** and the volume of material injected is controlled by the size of the intersection.

The embodiment shown in FIG. **6** can be used for various material manipulations. In one application, the laboratory system is used to inject an analyte from an analyte reservoir

**16B** through the intersection **40B** for separation in the separation channel **34B**. The analyte injector **10B** can be operated in either "load" mode or a "run" mode. Reservoir **16B** is supplied with an analyte and reservoir **12B** with buffer. Reservoir **18B** acts as an analyte waste reservoir, and reservoir **20B** acts as a waste reservoir.

In the "load" mode, at least two types of analyte introduction are possible. In the first, known as a "floating" loading, a potential is applied to the analyte reservoir **16B** with reservoir **18B** grounded. At the same time, reservoirs **12B** and **20B** are floating, meaning that they are neither coupled to the power source, nor grounded.

The second load mode is "pinched" loading mode, wherein potentials are simultaneously applied at reservoirs **12B**, **16B**, and **20B**, with reservoir **18B** grounded in order to control the injection plug shape as discussed in more detail below. As used herein, simultaneously controlling electrical potentials at plural reservoirs means that the electrodes are connected to a operating power source at the same chemically significant time period. Floating a reservoir means disconnecting the electrode in the reservoir from the power source and thus the electrical potential at the reservoir is not controlled.

In the "run" mode, a potential is applied to the buffer reservoir **12B** with reservoir **20B** grounded and with reservoirs **16B** and **18B** at approximately half of the potential of reservoir **12B**. During the run mode, the relatively high potential applied to the buffer reservoir **12B** causes the analyte in the intersection **40B** to move toward the waste reservoir **20B** in the separation column **34B**.

Diagnostic experiments were performed using rhodamine B and sulforhodamine **101** (Exciton Chemical Co., Inc.) as the analyte at  $60 \mu\text{M}$  for the CCD images and  $6 \mu\text{M}$  for the point detection. A sodium tetraborate buffer (50 mM, pH 9.2) was the mobile phase in the experiments. An injection of spatially well defined small volume ( $\approx 100$  pL) and of small longitudinal extent ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ), injection is beneficial when performing these types of analyses.

The analyte is loaded into the injection cross as a frontal electropherogram, and once the front of the slowest analyte component passes through the injection cross or intersection **40B**, the analyte is ready to be analyzed. In FIG. **7**, a CCD image (the area of which is denoted by the broken line square) displays the flow pattern of the analyte **54** (shaded area) and the buffer (white area) through the region of the injection intersection **40B**.

By pinching the flow of the analyte, the volume of the analytic plug is stable over time. The slight asymmetry of the plug shape is due to the different electric field strengths in the buffer channel **26B** (470 V/cm) and the separation channel **34B** (100 V/cm) when 1.0 kV is applied to the buffer, the analyte and the waste reservoirs, and the analyte waste reservoir is grounded. However, the different field strengths do not influence the stability of the analyte plug injected. Ideally, when the analyte plug is injected into the separation channel **34B**, only the analyte in the injection cross or intersection **40B** would migrate into the separation channel.

The volume of the injection plug in the injection cross is approximately 120 pL with a plug length of  $130 \mu\text{m}$ . A portion of the analyte **54** in the analyte channel **30B** and the analyte waste channel **32B** is drawn into the separation channel **34B**. Following the switch to the separation (run) mode, the volume of the injection plug is approximately 250 pL with a plug length of  $208 \mu\text{m}$ . These dimensions are estimated from a series of CCD images taken immediately after the switch is made to the separation mode.

The two modes of loading were tested for the analyte introduction into the separation channel 34B. The analyte was placed in the analyte reservoir 16B, and in both injection schemes was "transported" in the direction of reservoir 18B, a waste reservoir. CCD images of the two types of injections are depicted in FIGS. 8(a)–8(c). FIG. 8(a) schematically shows the intersection 40B, as well as the end portions of channels.

The CCD image of FIG. 8(b) is of loading in the pinched mode, just prior to being switched to the run mode. In the pinched mode, analyte (shown as white against the dark background) is pumped electrophoretically and electroosmotically from reservoir 16B to reservoir 18B (left to right) with buffer from the buffer reservoir 12B (top) and the waste reservoir 20B (bottom) traveling toward reservoir 18B (right). The voltages applied to reservoirs 12B, 16B, 18B, and 20B were 90%, 90%, 0, and 100%, respectively, of the power supply output which correspond to electric field strengths in the corresponding channels of 400, 270, 690 and 20 V/cm, respectively. Although the voltage applied to the waste reservoir 20B is higher than voltage applied to the analyte reservoir 18B, the additional length of the separation channel 34B compared to the analyte channel 30B provides additional electrical resistance, and thus the flow from the analyte buffer 16B into the intersection predominates. Consequently, the analyte in the injection cross or intersection 40B has a trapezoidal shape and is spatially constricted in the channel 32B by this material transport pattern.

FIG. 8(c) shows a floating mode loading. The analyte is pumped from reservoir 16B to 18B as in the pinched injection except no potential is applied to reservoirs 12B and 20B. By not controlling the flow of mobile phase (buffer) in channel portions 26B and 34B, the analyte is free to expand into these channels through convective and diffusive flow, thereby resulting in an extended injection plug.

When comparing the pinched and floating injections, the pinched injection is superior in three areas: temporal stability of the injected volume, the precision of the injected volume, and plug length. When two or more analytes with vastly different mobilities are to be analyzed, an injection with temporal stability insures that equal volumes of the faster and slower moving analytes are introduced into the separation column or channel 34B. The high reproducibility of the injection volume facilitates the ability to perform quantitative analysis. A smaller plug length leads to a higher separation efficiency and, consequently, to a greater component capacity for a given instrument and to higher speed separations.

To determine the temporal stability of each mode, a series of CCD fluorescence images were collected at 1.5 second intervals starting just prior to the analyte reaching the injection intersection 40B. An estimate of the amount of analyte that is injected was determined by integrating the fluorescence in the intersection 40B and channels 26B and 34B. This fluorescence is plotted versus time in FIG. 9.

For the pinched injection, the injected volume stabilizes in a few seconds and has a stability of 1% relative standard deviation (RSD), which is comparable to the stability of the illuminating laser. For the floating injection, the amount of analyte to be injected into the separation channel 34B increases with time because of the dispersive flow of analyte into channels 26B and 34B. For a 30 second injection, the volume of the injection plug is ca. 90 pL and stable for the pinched injection versus ca. 300 pL and continuously increasing with time for a floating injection.

By monitoring the separation channel at a point 0.9 cm from the intersection 40B, the reproducibility for the

pinched injection mode was tested by integrating the area of the band profile following introduction into the separation channel 34B. For six injections with a duration of 40 seconds, the reproducibility for the pinched injection is 0.7% RSD. Most of this measured instability is from the optical measurement system. The pinched injection has a higher reproducibility because of the temporal stability of the volume injected. With electronically controlled voltage switching, the RSD is expected to improve for both schemes.

The injection plug width and, ultimately, the resolution between analytes depends largely on both the flow pattern of the analyte and the dimensions of the injection cross or intersection 40B. For this column, the width of the channel at the top is 90  $\mu\text{m}$  but a channel width of 10  $\mu\text{m}$  is feasible which would lead to a decrease in the volume of the injection plug from 90 pL down to 1 pL with a pinched injection.

There are situations where it may not be desirable to reverse the flow in the separation channel as described above for the "pinched" and "floating" injection schemes. Examples of such cases might be the injection of a new sample plug before the preceding plug has been completely eluted or the use of a post-column reactor where reagent is continuously being injected into the end of the separation column. In the latter case, it would in general not be desirable to have the reagent flowing back up into the separation channel.

#### Alternate Analyte Injector

FIG. 10 illustrates an alternate analyte injector system 10C having six different ports or channels 26C, 30C, 32C, 34C, 56, and 58 respectively connected to six different reservoirs 12C, 16C, 18C, 20C, 60, and 62. The letter C after each element number indicates that the indicated element is analogous to a correspondingly numbered elements of FIG. 1. The microchip laboratory system 10C is similar to laboratory systems 10, 10A, and 10B described previously, in that an injection cross or intersection 40C is provided. In the FIG. 10 embodiment, a second intersection 64 and two additional reservoirs 60 and 62 are also provided to overcome the problems with reversing the flow in the separation channel.

Like the previous embodiments, the analyte injector system 10C can be used to implement an analyte separation by electrophoresis or chromatography or dispense material into some other processing element. In the laboratory system 10C, the reservoir 12C contains separating buffer, reservoir 16C contains the analyte, and reservoirs 18C and 20C are waste reservoirs. Intersection 40C preferably is operated in the pinched mode as in the embodiment shown in FIG. 6. The lower intersection 64, in fluid communication with reservoirs 60 and 62, are used to provide additional flow so that a continuous buffer stream can be directed down towards the waste reservoir 20C and, when needed, upwards toward the injection intersection 40C. Reservoir 60 and attached channel 56 are not necessary, although they improve performance by reducing band broadening as a plug passes the lower intersection 64. In many cases, the flow from reservoir 60 will be symmetric with that from reservoir 62.

FIG. 11 is an enlarged view of the two intersections 40C and 64. The different types of arrows show the flow directions at given instances in time for injection of a plug of analyte into the separation channel. The solid arrows show the initial flow pattern where the analyte is electrokinetically pumped into the upper intersection 40C and "pinched" by material flow from reservoirs 12C, 60, and 62 toward this

same intersection. Flow away from the injection intersection 40C is carried to the analyte waste reservoir 18C. The analyte is also flowing from the reservoir 16C to the analyte waste reservoir 18C. Under these conditions, flow from reservoir 60 (and reservoir 62) is also going down the separation channel 34C to the waste reservoir 20C. Such a flow pattern is created by simultaneously controlling the electrical potentials at all six reservoirs.

A plug of the analyte is injected through the injection intersection 40C into the separation channel 34C by switching to the flow profile shown by the short dashed arrows. Buffer flows down from reservoir 12C to the injection intersection 40C and towards reservoirs 16C, 18C, and 20C. This flow profile also pushes the analyte plug toward waste reservoir 20C into the separation channel 34C as described before. This flow profile is held for a sufficient length of time so as to move the analyte plug past the lower intersection 64. The flow of buffer from reservoirs 60 and 62 should be low as indicated by the short arrow and into the separation channel 34C to minimize distortion.

The distance between the upper and lower intersections 40C and 64, respectively, should be as small as possible to minimize plug distortion and criticality of timing in the switching between the two flow conditions. Electrodes for sensing the electrical potential may also be placed at the lower intersection and in the channels 56 and 58 to assist in adjusting the electrical potentials for proper flow control. Accurate flow control at the lower intersection 64 may be necessary to prevent undesired band broadening.

After the sample plug passes the lower intersection, the potentials are switched back to the initial conditions to give the original flow profile as shown with the long dashed arrows. This flow pattern will allow buffer flow into the separation channel 34C while the next analyte plug is being transported to the plug fanning region in the upper intersection 40C. This injection scheme will allow a rapid succession of injections to be made and may be very important for samples that are slow to migrate or if it takes a long time to achieve a homogeneous sample at the upper intersection 40C such as with entangled polymer solutions. This implementation of the pinched injection also maintains unidirectional flow through the separation channel as might be required for a post-column reaction as discussed below with respect to FIG. 22.

#### Serpentine Channel

Another embodiment of the invention is the modified analyte injector system 10D shown in FIG. 12. The laboratory system 10D shown in FIG. 12 is substantially identical to the laboratory system 10B shown in FIG. 6, except that the separation channel 34D follows a serpentine path. The serpentine path of the separation channel 34D allows the length of the separation channel to be greatly increased without substantially increasing the area of the substrate 49D needed to implement the serpentine path. Increasing the length of the separation channel 34D increases the ability of the laboratory system 10D to distinguish elements of an analyte. In one particularly preferred embodiment, the enclosed length (that which is covered by the cover plate 49D) of the channels extending from reservoir 16D to reservoir 18D is 19 mm, while the length of channel portion 26D is 6.4 mm and channel 34D is 171 mm. The turn radius of each turn of the channel 34D, which serves as a separation column, is 0.16 mm.

To perform a separation using the modified analyte injector system 10D, an analyte is first loaded into the injection intersection 40D using one of the loading methods described above. After the analyte has been loaded into the intersection

40D of the microchip laboratory system 10, the voltages are manually switched from the loading mode to the run (separation) mode of operation. FIGS. 13(a)–13(e) illustrate a separation of rhodamine B (less retained) and sulforhodamine (more retained) using the following conditions:  $E_{inj}=400$  V/cm,  $E_{run}=150$  V/cm, buffer=50 mM sodium tetraborate at pH 9.2. The CCD images demonstrate the separation process at 1 second intervals, with FIG. 13(a) showing a schematic of the section of the chip imaged, and with FIGS. 13(b)–13(e) showing the separation unfold.

FIG. 13(b) again shows the pinched injection with the applied voltages at reservoirs 12D, 16D, and 20D equal and reservoir 18D grounded. FIGS. 13(c)–13(e) shows the plug moving away from the intersection at 1, 2, and 3 seconds, respectively, after switching to the run mode. In FIG. 13(c), the injection plug is migrating around a 90° turn, and band distortion is visible due to the inner portion of the plug traveling less distance than the outer portion. By FIG. 13(d), the analytes have separated into distinct bands, which are distorted in the shape of a parallelogram. In FIG. 13(e), the bands are well separated and have attained a more rectangular shape, i.e., collapsing of the parallelogram, due to radial diffusion, an additional contribution to efficiency loss.

When the switch is made from the load mode to the run mode, a clean break of the injection plug from the analyte stream is desired to avoid tailing. This is achieved by pumping the mobile phase or buffer from channel 26D into channels 30D, 32D, and 34D simultaneously by maintaining the potential at the intersection 40D below the potential of reservoir 12D and above the potentials of reservoirs 16D, 18D, and 20D.

In the representative experiments described herein, the intersection 40D was maintained at 66% of the potential of reservoir 12D during the run mode. This provided sufficient flow of the analyte back away from the injection intersection 40D down channels 30D and 32D without decreasing the field strength in the separation channel 34D significantly. Alternate channel designs would allow a greater fraction of the potential applied at reservoir 12D to be dropped across the separation channel 34D, thereby improving efficiency.

This three way flow is demonstrated in FIGS. 13(c)–13(e) as the analytes in channels 30D and 32D (left and right, respectively) move further away from the intersection with time. Three way flow permits well-defined, reproducible injections with minimal bleed of the analyte into the separation channel 34D.

#### Detectors

In most applications envisaged for these integrated microsystems for chemical analysis or synthesis it will be necessary to quantify the material present in a channel at one or more positions similar to conventional laboratory measurement processes. Techniques typically utilized for quantification include, but are not limited to, optical absorbance, refractive index changes, fluorescence emission, chemiluminescence, various forms of Raman spectroscopy, electrical conductometric measurements, electrochemical amperometric measurements, acoustic wave propagation measurements.

Optical absorbance measurements are commonly employed with conventional laboratory analysis systems because of the generality of the phenomenon in the UV portion of the electromagnetic spectrum. Optical absorbance is commonly determined by measuring the attenuation of impinging optical power as it passes through a known length of material to be quantified. Alternative approaches are possible with laser technology including photo acoustic and photo thermal techniques. Such measurements can be uti-

lized with the microchip technology discussed here with the additional advantage of potentially integrating optical wave guides on microfabricated devices. The use of solid-state optical sources such as LEDs and diode lasers with and without frequency conversion elements would be attractive for reduction of system size. Integration of solid state optical source and detector technology onto a chip does not presently appear viable but may one day be of interest.

Refractive index detectors have also been commonly used for quantification of flowing stream chemical analysis systems because of generality of the phenomenon but have typically been less sensitive than optical absorption. Laser based implementations of refractive index detection could provide adequate sensitivity in some situations and have advantages of simplicity. Fluorescence emission (or fluorescence detection) is an extremely sensitive detection technique and is commonly employed for the analysis of biological materials. This approach to detection has much relevance to miniature chemical analysis and synthesis devices because of the sensitivity of the technique and the small volumes that can be manipulated and analyzed (volumes in the picoliter range are feasible). For example, a 100 pL sample volume with 1 nM concentration of analyte would have only 60,000 analyte molecules to be processed and detected. There are several demonstrations in the literature of detecting a single molecule in solution by fluorescence detection. A laser source is often used as the excitation source for ultrasensitive measurements but conventional light sources such as rare gas discharge lamps and light emitting diodes (LEDs) are also used. The fluorescence emission can be detected by a photomultiplier tube, photodiode or other light sensor. An array detector such as a charge coupled device (CCD) detector can be used to image an analyte spatial distribution.

Raman spectroscopy can be used as a detection method for microchip devices with the advantage of gaining molecular vibrational information, but with the disadvantage of relatively poor sensitivity. Sensitivity has been increased through surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) effects but only at the research level. Electrical or electrochemical detection approaches are also of particular interest for implementation on microchip devices due to the ease of integration onto a microfabricated structure and the potentially high sensitivity that can be attained. The most general approach to electrical quantification is a conductometric measurement, i.e., a measurement of the conductivity of an ionic sample. The presence of an ionized analyte can correspondingly increase the conductivity of a fluid and thus allow quantification. Amperometric measurements imply the measurement of the current through an electrode at a given electrical potential due to the reduction or oxidation of a molecule at the electrode. Some selectivity can be obtained by controlling the potential of the electrode but it is minimal. Amperometric detection is a less general technique than conductivity because not all molecules can be reduced or oxidized within the limited potentials that can be used with common solvents. Sensitivities in the 1 nM range have been demonstrated in small volumes (10 nL). The other advantage of this technique is that the number of electrons measured (through the current) is equal to the number of molecules present. The electrodes required for either of these detection methods can be included on a microfabricated device through a photolithographic patterning and metal deposition process. Electrodes could also be used to initiate a chemiluminescence detection process, i.e., an excited state molecule is generated via an oxidation-reduction process which then transfers its energy to an analyte molecule, subsequently emitting a photon that is detected.

Acoustic measurements can also be used for quantification of materials but have not been widely used to date. One method that has been used primarily for gas phase detection is the attenuation or phase shift of a surface acoustic wave (SAW). Adsorption of material to the surface of a substrate where a SAW is propagating affects the propagation characteristics and allows a concentration determination. Selective sorbents on the surface of the SAW device are often used. Similar techniques may be useful in the devices described herein.

The mixing capabilities of the microchip laboratory systems described herein lend themselves to detection processes that include the addition of one or more reagents. Derivatization reactions are commonly used in biochemical assays. For example, amino acids, peptides and proteins are commonly labeled with dansylating reagents or o-phthalaldehyde to produce fluorescent molecules that are easily detectable. Alternatively, an enzyme could be used as a labeling molecule and reagents, including substrate, could be added to provide an enzyme amplified detection scheme, i.e., the enzyme produces a detectable product. There are many examples where such an approach has been used in conventional laboratory procedures to enhance detection, either by absorbance or fluorescence. A third example of a detection method that could benefit from integrated mixing methods is chemiluminescence detection. In these types of detection scenarios, a reagent and a catalyst are mixed with an appropriate target molecule to produce an excited state molecule that emits a detectable photon.

#### Analyte Stacking

To enhance the sensitivity of the microchip laboratory system 10D, an analyte pre-concentration can be performed prior to the separation. Concentration enhancement is a valuable tool especially when analyzing environmental samples and biological materials, two areas targeted by microchip technology. Analyte stacking is a convenient technique to incorporate with electrophoretic analyses. To employ analyte stacking, the analyte is prepared in a buffer with a lower conductivity than the separation buffer. The difference in conductivity causes the ions in the analyte to stack at the beginning or end of the analyte plug, thereby resulting in a concentrated analyte plug portion that is detected more easily. More elaborate preconcentration techniques include two and three buffer systems, i.e., transient isotachophoretic preconcentration. It will be evident that the greater the number of solutions involved, the more difficult the injection technique is to implement. Pre-concentration steps are well suited for implementation on a microchip. Electroosmotically driven flow enables separation and sample buffers to be controlled without the use of valves or pumps. Low dead volume connections between channels can be easily fabricated enabling fluid manipulation with high precision, speed and reproducibility.

Referring again to FIG. 12, the pre-concentration of the analyte is performed at the top of the separation channel 34D using a modified gated injection to stack the analyte. First, an analyte plug is introduced onto the separation channel 34D using electroosmotic flow. The analyte plug is then followed by more separation buffer from the buffer reservoir 16D. At this point, the analyte stacks at the boundaries of the analyte and separation buffers. Dansylated amino acids were used as the analyte, which are anions that stack at the rear boundary of the analyte buffer plug. Implementation of the analyte stacking is described along with the effects of the stacking on both the separation efficiency and detection limits.

To employ a gated injection using the microchip laboratory system 10D, the analyte is stored in the top reservoir

12D and the buffer is stored in the left reservoir 16D. The gated injection used for the analyte stacking is performed, on an analyte having an ionic strength that is less than that of the running buffer. Buffer is transported by electroosmosis from the buffer reservoir 16D towards both the analyte waste and waste reservoirs 18D, 20D. This buffer stream prevents the analyte from bleeding into the separation channel 34D. Within a representative embodiment, the relative potentials at the buffer, analyte, analyte waste and waste reservoirs are 1, 0.9, 0.7 and 0, respectively. For 1 kV applied to the microchip, the field strengths in the buffer, analyte, analyte waste, and separation channels during the separation are 170, 130, 180, and 120 V/cm, respectively.

To inject the analyte onto the separation channel 34D, the potential at the buffer reservoir 16D is floated (opening of the high voltage switch) for a brief period of time (0.1 to 10 s), and analyte migrates into the separation channel. For 1 kV applied to the microchip, the field strengths in the buffer, sample, sample waste, and separation channels during the injection are 0, 240, 120, and 110 V/cm, respectively. To break off the analyte plug, the potential at the buffer reservoir 16D is reapplied (closing of a high voltage switch). The volume of the analyte plug is a function of the injection time, electric field strength, and electrophoretic mobility.

The separation buffer and analyte compositions can be quite different, yet with the gated injections the integrity of both the analyte and buffer streams can be alternately maintained in the separation channel 34D to perform the stacking operation. The analyte stacking depends on the relative conductivity of the separation buffer to analyte,  $\gamma$ . For example, with a 5 mM separation buffer and a 0.516 mM sample (0.016 mM dansyl-lysine and 0.5 mM sample buffer),  $\gamma$  is equal to 9.7. FIG. 14 shows two injection profiles for didansyl-lysine injected for 2 s with  $\gamma$  equal to 0.97 and 9.7. The injection profile with  $\gamma=0.97$  (the separation and sample buffers are both 5 mM) shows no stacking. The second profile with  $\gamma=9.7$  shows a modest enhancement of 3.5 for relative peak heights over the injection with  $\gamma=0.97$ . Didansyl-lysine is an anion, and thus stacks at the rear boundary of the sample buffer plug. In addition to increasing the analyte concentration, the spatial extent of the plug is confined. The injection profile with  $\gamma=9.7$  has a width at half-height of 0.41 s, while the injection profile with  $\gamma=0.97$  has a width at half-height of 1.88 s. The electric field strength in the separation channel 34D during the injection (injection field strength) is 95% of the electric field strength in the separation channel during the separation (separation field strength). These profiles are measured while the separation field strength is applied. For an injection time of 2 s, an injection plug width of 1.9 s is expected for  $\gamma=0.97$ .

The concentration enhancement due to stacking was evaluated for several sample plug lengths and relative conductivities of the separation buffer and analyte. The enhancement due to stacking increases with increasing relative conductivities,  $\gamma$ . In Table 1, the enhancement is listed for  $\gamma$  from 0.97 to 970. Although the enhancement is largest when  $\gamma=970$ , the separation efficiency suffers due to an electroosmotic pressure originating at the concentration boundary when the relative conductivity is too large. A compromise between the stacking enhancement and separation efficiency must be reached and  $\gamma=10$  has been found to be optimal. For separations performed using stacked injections with  $\gamma=97$  and 970, didansyl-lysine and dansyl-isoleucine could not be resolved due to a loss in efficiency. Also, because the injection process on the microchip is computer controlled, and the column is not physically transported from vial to vial, the reproducibility of the stacked

injections is 2.1% rsd (percent relative standard deviation) for peak area for 6 replicate analyses. For comparison, the non-stacked, gated injection has a 1.4% rsd for peak area for 6 replicate analyses, and the pinched injection has a 0.75% rsd for peak area for 6 replicate analyses. These correspond well to reported values for large-scale, commercial, automated capillary electrophoresis instruments. However, injections made on the microchip are  $\approx 100$  times smaller in volume, e.g. 100 pL on the microchip versus 10 nL on a commercial instrument.

TABLE 1

Variation of stacking enhancement with relative conductivity, $\gamma$ .	
$\gamma$	Concentration Enhancement
0.97	1
9.7	6.5
97	11.5
970	13.8

Buffer streams of different conductivities can be accurately combined on microchips. Described herein is a simple stacking method, although more elaborate stacking schemes can be employed by fabricating a microchip with additional buffer reservoirs. In addition, the leading and trailing electrolyte buffers can be selected to enhance the sample stacking, and ultimately, to lower the detection limits beyond that demonstrated here. It is also noted that much larger enhancements are expected for inorganic (elemental) cations due to the combination of field amplified analyte injection and better matching of analyte and buffer ion mobilities.

Regardless of whether sample stacking is used, the microchip laboratory system 10D of FIG. 12 can be employed to achieve electrophoretic separation of an analyte composed of rhodamine B and sulforhodamine. FIG. 15 are electropherograms at (a) 3.3 cm, (b) 9.9 cm, and (c) 16.5 cm from the point of injection for rhodamine B (less retained) and sulforhodamine (more retained). These were taken using the following conditions: injection type was pinched,  $E_{inj}=500$  V/cm,  $E_{run}=170$  V/cm, buffer=50 mM sodium tetraborate at pH 9.2. To obtain electropherograms in the conventional manner, single point detection with the helium-neon laser (green line) was used at different locations down the axis of the separation channel 34D.

An important measure of the utility of a separation system is the number of plates generated per unit time, as given by the formula

$$N/t=L/(Ht)$$

where  $N$  is the number of theoretical plates,  $t$  is the separation time,  $L$  is the length of the separation column, and  $H$  is the height equivalent to a theoretical plate. The plate height,  $H$ , can be written as

$$H=A+B/u$$

where  $A$  is the sum of the contributions from the injection plug length and the detector path length,  $B$  is equal to  $2D_m$ , where  $D_m$  is the diffusion coefficient for the analyte in the buffer, and  $u$  is the linear velocity of the analyte.

Combining the two equations above and substituting  $u=\mu E$  where  $\mu$  is the effective electrophoretic mobility of the analyte and  $E$  is the electric field strength, the plates per unit time can be expressed as a function of the electric field strength:

$$N/t=(\mu E)^2/(A\mu E+B)$$

At low electric field strengths when axial diffusion is the dominant form of band dispersion, the term  $A\mu E$  is small relative to  $B$  and consequently, the number of plates per second increases with the square of the electric field strength.

As the electric field strength increases, the plate height approaches a constant value, and the plates per unit time increases linearly with the electric field strength because  $B$  is small relative to  $A\mu E$ . It is thus advantageous to have  $A$  as small as possible, a benefit of the pinched injection scheme.

The efficiency of the electrophoretic separation of rhodamine B and sulforhodamine at ten evenly spaced positions was monitored, each constituting a separate experiment. At 16.5 cm from the point of injection, the efficiencies of rhodamine B and sulforhodamine are 38,100 and 29,000 plates, respectively. Efficiencies of this magnitude are sufficient for many separation applications. The linearity of the data provides information about the uniformity and quality of the channel along its length. If a defect in the channel, e.g., a large pit, was present a sharp decrease in the efficiency would result; however, none was detected. The efficiency data are plotted in FIG. 16 (conditions for FIG. 16 were the same as for FIG. 15).

A similar separation experiment was performed using the microchip analyte injector 10B of FIG. 6. Because of the straight separation channel 34B, the analyte injector 10B enables faster separations than are possible using the serpentine separation channel 34D of the alternate analyte injector 10D shown in FIG. 12. In addition, the electric field strengths used were higher (470 V/cm and 100 V/cm for the buffer and separation channels 26B, 34B, respectively), which further increased the speed of the separations.

One particular advantage to the planar microchip laboratory system 10B of the present invention is that with laser induced fluorescence the point of detection can be placed anywhere along the separation column. The electropherograms are detected at separation length of 0.9 mm, 1.6 mm and 11.1 mm from the injection intersection 40B. The 1.6 mm and 11.1 mm separation lengths were used over a range of electric field strengths from 0.06 to 1.5 kV/cm, and the separations had baseline resolution over this range. At an electric field strength of 1.5 kV/cm, the analytes, rhodamine B and fluorescein, are resolved in less than 150 ms for the 0.9 mm separation length, as shown in FIG. 17(a), in less than 260 ms for the 1.6 mm separation length, as shown in FIG. 17(b), and in less than 1.6 seconds for the 11.1 mm separation length, as shown in FIG. 17(c).

Due to the trapezoidal geometry of the channels, the upper corners make it difficult to cut the sample plug away precisely when the potentials are switched from the sample loading mode to the separation mode. Thus, the injection plug has a slight tail associated with it, and this effect probably accounts for the tailing observed in the separated peaks.

In FIG. 18, the number of plates per second for the 1.6 mm and 11.1 mm separation lengths are plotted versus the electric field strength. The number of plates per second quickly becomes a linear function of the electric field strength, because the plate height approaches a constant value. The symbols in FIG. 18 represent the experimental data collected for the two analytes at the 1.6 mm and 11.1 mm separation lengths. The lines are calculated using the previously-stated equation and the coefficients are experimentally determined. A slight deviation is seen between the experimental data and the calculated numbers for rhodamine B at the 11.1 mm separation length. This is primarily due to experimental error.

## Electrochromatography

A problem with electrophoresis for general analysis is its inability to separate uncharged species. All neutral species in a particular sample will have zero electrophoretic mobility, and thus, the same migration time. The microchip analyte injector 10D shown in FIG. 12 can also be used to perform electrochromatography to separate non-ionic analytes. To perform such electrochromatography, the surface of the separation channel 34D was prepared by chemically bonding a reverse, phase coating to the walls of the separation channel after bonding the cover plate to the substrate to enclose the channels. The separation channel was treated with 1M sodium hydroxide and then rinsed with water. The separation channel was dried at 125° C. for 24 hours while purging with helium at a gauge pressure of approximately 50 kPa. A 25% (w/w) solution of chlorodimethyloctadecylsilane (ODS, Aldrich) in toluene was loaded into the separation channel with an over pressure of helium at approximately 90 kPa. The ODS/toluene mixture was pumped continuously into the column throughout the 18 hour reaction period at 125° C. The channels are rinsed with toluene and then with acetonitrile to remove the unreacted ODS. The laboratory system 10D was used to perform electrochromatography on an analytes composed of coumarin 440 (C440), coumarin 450 (C450) and coumarin 460 (C460, Exciton Chemical Co., Inc.) at 10  $\mu$ M for the direct fluorescent measurements of the separations and 1  $\mu$ M for the indirect fluorescent measurements of the void time. A sodium tetraborate buffer (10 mM, pH 9.2) with 25% (v/v) acetonitrile was the buffer.

The analyte injector 10D was operated under a pinched analyte loading mode and a separation (run) mode as described above with respect to FIG. 6. The analyte is loaded into the injection cross via a frontal chromatogram traveling from the analyte reservoir 16D to the analyte waste reservoir 18D, and once the front of the slowest analyte passes through the injection intersection 40D, the sample is ready to be analyzed. To switch to the separation mode, the applied potentials are reconfigured, for instance by manually throwing a switch. After switching the applied potentials, the primary flow path for the separation is from the buffer reservoir 12D to the waste reservoir 20D. In order to inject a small analyte plug into the separation channel 34D and to prevent bleeding of the excess analyte into the separation channel, the analyte and the analyte waste reservoirs 16D, 18D are maintained at 57% of the potential applied to the buffer reservoir 12D. This method of loading and injecting the sample is time-independent, non-biased and reproducible.

In FIG. 19, a chromatogram of the coumarins is shown for a linear velocity of 0.65 mm/s. For C440, 11700 plates was observed which corresponds to 120 plates/s. The most retained component, C460, has an efficiency nearly an order of magnitude lower than for C440, which was 1290 plates. The undulating background in the chromatograms is due to background fluorescence from the glass substrate and shows the power instability of the laser. This, however, did not hamper the quality of the separations or detection. These results compare quite well with conventional laboratory High Performance LC (HPLC) techniques in terms of plate numbers and exceed HPLC in speed by a factor of ten. Efficiency is decreasing with retention faster than would be predicted by theory. This effect may be due to overloading of the monolayer stationary or kinetic effects due to the high speed of the separation.

## Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

In the electrochromatography experiments discussed above with respect to FIG. 19, sample components were

separated by their partitioning interaction with a stationary phase coated on the channel walls. Another method of separating neutral analytes is micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). MECC is an operational mode of electrophoresis in which a surfactant such as sodium dodecylsulfate (SDS) is added to the buffer in sufficient concentration to form micelles in the buffer. In a typical experimental arrangement, the micelles move much more slowly toward the cathode than does the surrounding buffer solution. The partitioning of solutes between the micelles and the surrounding buffer solution provides a separation mechanism similar to that of liquid chromatography.

The microchip laboratory **10D** of FIG. **12** was used to perform on an analyte composed of neutral dyes coumarin 440 (C440), coumarin 450 (C450), and coumarin 460 (C460, Exciton Chemical Co., Inc.). Individual stock solutions of each dye were prepared in methanol then diluted into the analysis buffer before use. The concentration of each dye was approximately 50  $\mu$ M unless indicated otherwise. The MECC buffer was composed of 10 mM sodium borate (pH 9.1), 50 mM SDS, and 10% (v/v) methanol. The methanol aids in solubilizing the coumarin dyes in the aqueous buffer system and also affects the partitioning of some of the dyes into the micelles. Due care must be used in working with coumarin dyes as the chemical, physical, and toxicological properties of these dyes have not been fully investigated.

The microchip laboratory system **10D** was operated in the "pinched injection" mode described previously. The voltages applied to the reservoirs are set to either loading mode or a "run" (separation) mode. In the loading mode, a frontal chromatogram of the solution in the analyte reservoir **16D** is pumped electroosmotically through the intersection and into the analyte waste reservoir **18D**. Voltages applied to the buffer and waste reservoirs also cause weak flows into the intersection from the sides, and then into the analyte waste reservoir **18D**. The chip remains in this mode until the slowest moving component of the analyte has passed through the intersection **40D**. At this point, the analyte plug in the intersection is representative of the analyte solution, with no electrokinetic bias.

An injection is made by switching the chip to the "run" mode which changes the voltages applied to the reservoirs such that buffer now flows from the buffer reservoir **12D** through the intersection **40D** into the separation channel **34D** toward the waste reservoir **20D**. The plug of analyte that was in the intersection **40D** is swept into the separation channel **34D**. Proportionately lower voltages are applied to the analyte and analyte waste reservoirs **16D**, **18D** to cause a weak flow of buffer from the buffer reservoir **12D** into these channels. These flows ensure that the sample plug is cleanly "broken off" from the analyte stream, and that no excess analyte leaks into the separation channel during the analysis.

The results of the MECC analysis of a mixture of C440, C450, and C460 are shown in FIG. **20**. The peaks were identified by individual analyses of each dye. The migration time stability of the first peak, C440, with changing methanol concentration was a strong indicator that this dye did not partition into the micelles to a significant extent. Therefore it was considered an electroosmotic flow marker with migration time **t0**. The last peak, C460, was assumed to be a marker for the micellar migration time, **tm**. Using these values of **t0** and **tm** from the data in FIG. **20**, the calculated elution range, **t0/tm**, is 0.43. This agrees well with a literature value of **t0/tm** = 0.4 for a similar buffer system, and

supports our assumption. These results compare well with conventional MECC performed in capillaries and also shows some advantages over the electrochromatography experiment described above in that efficiency is retained with retention ratio. Further advantages of this approach to separating neutral species is that no surface modification of the walls is necessary and that the stationary phase is continuously refreshed during experiments.

#### Inorganic Ion Analysis

Another laboratory analysis that can be performed on either the laboratory system **10B** of FIG. **6** or the laboratory system **10D** of FIG. **12** is inorganic ion analysis. Using the laboratory system **10B** of FIG. **6**, inorganic ion analysis was performed on metal ions complexed with 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (HQS) which are separated by electrophoresis and detected with UV laser induced fluorescence. HQS has been widely used as a ligand for optical determinations of metal ions. The optical properties and the solubility of HQS in aqueous media have recently been used for detection of metal ions separated by ion chromatography and capillary electrophoresis. Because uncomplexed HQS does not fluoresce, excess ligand is added to the buffer to maintain the complexation equilibria during the separation without contributing a large background signal. This benefits both the efficiency of the separation and detectability of the sample. The compounds used for the experiments are zinc sulfate, cadmium nitrate, and aluminum nitrate. The buffer is sodium phosphate (60 mM, pH 6.9) with 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (20 mM for all experiments except FIG. **5**; Sigma Chemical Co.). At least 50 mM sodium phosphate buffer is needed to dissolve up to 20 mM HQS. The substrate **49B** used was fused quartz which provides greater visibility than glass substrates.

The floating or pinched analyte loading, as described previously with respect to FIG. **6**, is used to transport the analyte to the injection intersection **40B**. With the floating sample loading, the injected plug has no electrophoretic bias, but the volume of sample is a function of the sample loading time. Because the sample loading time is inversely proportional to the field strength used, for high injection field strengths a shorter injection time is used than for low injection field strengths. For example, for an injection field strength of 630 V/cm (FIG. **3a**), the injection time is 12 s, and for an injection field strength of 520 V/cm FIG. **3b**), the injection time is 14.5 s. Both the pinched and floating sample loading can be used with and without suppression of the electroosmotic flow.

FIGS. **21(a)** and **21(b)** show the separation of three metal ions complexed with 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid. All three complexes have a net negative charge. With the electroosmotic flow minimized by the covalent bonding of polyacrylamide to the channel walls, negative potentials relative to ground are used to manipulate the complexes during sample loading and separation. In FIGS. **21(a)** and **21(b)**, the separation channel field strength is 870 and 720 V/cm, respectively, and the separation length is 16.5 mm. The volume of the injection plug is 120 pL which corresponds to 16, 7, and 19 fmol injected for Zn, Cd, and Al, respectively, for FIG. **4a**. In FIG. **4b**, 0.48, 0.23, and 0.59 fmol of Zn, Cd, and Al, respectively, are injected onto the separation column. The average reproducibility of the amounts injected is 1.6% *rsd* (percent relative standard deviation) as measured by peak areas (6 replicate analyses). The stability of the laser used to excite the complexes is  $\approx$ 1% *rsd*. The detection limits are in a range where useful analyses can be performed.

## Post-Separation Channel Reactor

An Internate microchip laboratory system 10E is shown in FIG. 22. The five-port pattern of channels is disposed on a substrate 49E and with a cover slip 49E', as in the previously-described embodiments. The microchip laboratory system 10E embodiment was fabricated using standard photolithographic, wet chemical etching, and bonding techniques. A photomask was fabricated by sputtering chrome (50 nm) onto a glass slide and ablating the channel design into the chrome film via a CAD/CAM laser ablation system Resonetics, Inc.). The channel design was then transferred onto the substrates using a positive photoresist. The channels were etched into the substrate in a dilute  $\text{Hf/Nh}_3\text{F}$  bath. To form the separation channel 34E, a coverplate was bonded to the substrate over the etched channels using a direct bonding technique. The surfaces were hydrolyzed in dilute  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$  solution, rinsed in deionized, filtered  $\text{H}_2$ , joined and then annealed at  $500^\circ\text{C}$ . Cylindrical glass reservoirs were affixed on the substrate using RTV silicone (made by General Electric). Platinum electrodes provided electrical contact from the voltage controller 46E (Spellman CZE1000R) to the solutions in the reservoirs.

The channel 26E is in one embodiment 2.7 mm in length from the first reservoir 12E to the intersection 40E, while the channel 30E is 1.0 mm, and the third channel 32E is 6.7 mm. The separation channel 34E is modified to be only 7.0 mm in length, due to the addition of a reagent reservoir 22E which has a reagent channel 36E that connects to the separation channel 34E at a mixing tee 44E. Thus, the length of the separation channel 34E is measured from the intersection 40E to the mixing tee 44E. The channel 56 extending from the mixing tee 44E to the waste reservoir 20E is the reaction column or channel, and in the illustrated embodiment this channel is 10.8 mm in length. The length of the reagent channel 36E is 11.6 mm.

In a representative example, the FIG. 22 embodiment was used to separate an analyte and the separation was monitored on-microchip via fluorescence using an argon ion laser (351.1 nm, 50 mW, Coherent Innova 90) for excitation. The fluorescence signal was collected with a photomultiplier tube (PMT, Oriel 77340) for point detection and a charge coupled device (CCD, Princeton Instruments, Inc. TE/CCD-512TKM) for imaging a region of the microchip 90. The compounds used for testing the apparatus were rhodamine B (Exciton Chemical Co., Inc.) arginine, glycine, threonine and o-phthalaldehyde (Sigma Chemical Co.) A sodium tetraborate buffer (20 mM pH 9.2) with 2% (v/v) methanol and 0.5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol was the buffer in all tests. The concentrations of the amino acid, OPA and rhodamine B solutions were 2 mM, 3.7 mM, and 50  $\mu\text{M}$ , respectively. Several run conditions were utilized.

The schematic view in FIG. 23 demonstrates one example when 1 kV is applied to the entire system. With this voltage configuration, the electric field strengths in the separation channel 34E ( $E_{sep}$ ) and the reaction channel 36E ( $E_{rxn}$ ) are 200 and 425 V/cm, respectively. This allows the combining of 1 part separation effluent with 1.125 parts reagent at the mixing tee 44E. An analyte introduction system such as this, with or without post-column reaction, allows a very rapid cycle time for multiple analyses.

The electropherograms; (A) and (B) in FIG. 24 demonstrate the separation of two pairs of amino acids. The voltage configuration is the same as in FIG. 23, except the total applied voltage is 4 kV which corresponds to an electric field strength of 800 V/cm in the separation column ( $E_{sep}$ ) and 1,700 V/cm in the reaction column ( $E_r$ ). The injection times were 100 ms for the tests which correspond to estimated

injection plug lengths of 384, 245, and 225  $\mu\text{m}$  for arginine, glycine and threonine, respectively. The injection volumes of 102, 65, and 60 pL correspond to 200, 130, and 120 fmol injected for arginine, glycine and threonine, respectively. The point of detection is 6.5 mm downstream from the mixing tee which gives a total column length of 13.5 mm for the separation and reaction.

The reaction rates of the amino acids with the OPA are moderately fast, but not fast enough on the time scale of these experiments. An increase in the band distortion is observed because the mobilities of the derivatized compounds are different from the pure amino acids. Until the reaction is complete, the zones of unreacted and reacted amino acid will move at different velocities causing a broadening of the analyte zone. As evidenced in FIG. 24, glycine has the greatest discrepancy in electrophoretic mobilities between the derivatized and un-derivatized amino acid. To ensure that the excessive band broadening was not a function of the retention time, threonine was also tested. Threonine has a slightly longer retention time than the glycine; however the broadening is not as extensive as for glycine.

To test the efficiency of the microchip in both the separation column and the reaction column, a fluorescent laser dye, rhodamine B, was used as a probe. Efficiency measurements calculated from peak widths at half height were made using the point detection scheme at distances of 6 mm and 8 mm from the injection cross, or 1 mm upstream and 1 mm downstream from the mixing tee. This provided information on the effects of the mixing of the two streams.

The electric field strengths in the reagent column and the separation column were approximately equal, and the field strength in the reaction column was twice that of the separation column. This configuration of the applied voltages allowed an approximately 1:1 volume ratio of derivatizing reagent and effluent from the separation column. As the field strengths increased, the degree of turbulence at the mixing tee increased. At the separation distance of 6 mm (1 mm upstream from the mixing tee), the plate height as expected as the inverse of the linear velocity of the analyte. At the separation distance of 8 mm (1 mm upstream from the mixing tee), the plate height data decreased as expected as the inverse of the velocity of the analyte. At the separation distance of 8 mm (1 mm downstream from the mixing tee), the plate height data decreases from 140 V/cm to 280 V/cm to 1400 V/cm. This behavior is abnormal and demonstrates a band broadening phenomena when two streams of equal volumes converge. The geometry of the mixing tee was not optimized to minimize this band distortion. Above separation field strength of 840 V/cm, the system stabilizes and again the plate height decreases with increasing linear velocity. For  $E_{sep}=1400\text{ V/cm}$ , the ratio of the plate heights at the 8 mm and 6 mm separation lengths is 1.22 which is not an unacceptable loss in efficiency for the separation.

The intensity of the fluorescence signal generated from the reaction of OPA with an amino acid was tested by continuously pumping glycine down the separation channel to mix with the OPA at the mixing tee. The fluorescence signal from the OPA/amino acid reaction was collected using a CCD as the product moved downstream from the mixing tee. Again, the relative volume ratio of the OPA and glycine streams was 1.125. OPA has a typical half-time of reaction with amino acids of 4 s. The average residence times of an analyte molecule in the window of observation are 4.68, 2.34, 1.17, and 0.58 s for the electric field strengths in the reaction column ( $E_{rxn}$ ) of 240, 480, 960, and 1920 V/cm respectively. The relative intensities of the fluores-



cence correspond qualitatively to this 4 s half-time of reaction. As the field strength increases in the reaction channel, the slope and maximum of the intensity of the fluorescence shifts further downstream because the glycine and OPA are swept away from the mixing tee faster with higher field strengths. Ideally, the observed fluorescence from the product would have a step function of a response following the mixing of the separation effluent and derivatizing reagent. However, the kinetics of the reaction and a finite rate of mixing dominated by diffusion prevent this from occurring.

The separation using the post-separation channel reactor employed a gated injection scheme in order to keep the analyte, buffer and reagent streams isolated as discussed above with respect to FIG. 3. For the post-separation channel reactions, the microchip was operated in a continuous analyte loading/separation mode whereby the analyte was continuously pumped from the analyte reservoir 12E through the injection intersection 40E toward the analyte waste reservoir 18E. Buffer was simultaneously pumped from the buffer reservoir 16E toward the analyte waste and waste reservoirs 18E, 20E to deflect the analyte stream and prevent the analyte from migrating down the separation channel. To inject a small aliquot of analyte, the potentials at the buffer and analyte waste reservoirs 16F, 18E are simply floated for a short period of time ( $\sim 100$  ms) to allow the analyte to migrate down the separation channel as an analyte injection plug. To break off the injection plug, the potentials at the buffer and analyte waste reservoirs 16E, 18E are reapplied.

The use of micromachined post-column reactors can improve the power of post-separation channel reactions as an analytical tool by minimizing the volume of the extra-channel plumbing, especially between the separation and reagent channels 34E, 36E. This microchip design (FIG. 22) was fabricated with modest lengths for the separation channel 34E (7 mm) and reagent channel 36E (10.8 mm) which were more than sufficient for this demonstration. Longer separation channels can be manufactured on a similar size microchip using a serpentine path to perform more difficult separations as discussed above with respect to FIG. 12. To decrease post-mixing tee band distortions, the ratio of the channel dimensions between the separation channel 34E and reaction channel 56 should be minimized so that the electric field strength in the separation channel 34E is large, i.e., narrow channel, and in the reaction channel 56 is small, i.e., wide channel.

For capillary separation systems, the small detection volumes can limit the number of detection schemes that can be used to extract information. Fluorescence detection remains one of the most sensitive detection techniques for capillary electrophoresis. When incorporating fluorescence detection into a system that does not have naturally fluorescing analytes, derivatization of the analyte must occur either pre- or post-separation. When the fluorescent "tag" is short lived or the separation is hindered by pre-separation derivatization, post-column addition of derivatizing reagent becomes the method of choice. A variety of post-separation reactors have been demonstrated for capillary electrophoresis. However, the ability to construct a post-separation reactor with extremely low volume connections to minimize band distortion has been difficult. The present invention takes the approach of fabricating a microchip device for electrophoretic separations with an integrated post-separation reaction channel 56 in a single monolithic device enabling extremely low volume exchanges between individual channel functions.

#### Pre-Separation Channel Reaction System

Instead of the post-separation channel reactor design shown in FIG. 22, the microchip laboratory system 10F shown in FIG. 25 includes a pre-separation channel reactor. The pre-separation channel reactor design shown in FIG. 25 is similar to that shown in FIG. 1, except that the first and second channels 26F, 28F form a "goal-post" design with the reaction chamber 42F rather than the "Y" design of FIG. 1. The reaction chamber 42F was designed to be wider than the separation channel 34F to give lower electric field strengths in the reaction chamber and thus longer residence times for the reagents. The reaction chamber is  $96\text{ }\mu\text{m}$  wide at half-depth and  $6.2\text{ }\mu\text{m}$  deep, and the separation channel 34F is  $31\text{ }\mu\text{m}$  wide at half-depth and  $6.2\text{ }\mu\text{m}$  deep.

The microchip laboratory system 10F was used to perform on-line pre-separation channel reactions coupled with electrophoretic analysis of the reaction products. Here, the reactor is operated continuously with small aliquots introduced periodically into the separation channel 34F using the gated dispenser discussed above with respect to FIG. 3. The operation of the microchip consists of three elements: the derivatization of amino acids with o-phthalaldehyde (OPA), injection of the sample onto the separation column, and the separation/ detection of the components of the reactor effluent. The compounds used for the experiments were arginine (0.48 mM), glycine (0.58mM), and OPA (5.1 mM; Sigma Chemical Co). The buffer in all of the reservoirs was 20 mM sodium tetraborate with 2% (v/v) methanol and 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol. 2-mercaptoethanol is added to the buffer as a reducing agent for the derivatization reaction.

To implement the reaction the reservoirs 12F, 14F, 16F, 18F, and 20F were simultaneously given controlled voltages of 0.5 HV, 0.5 HV, HV, 0.2 HV, and ground, respectively. This configuration allowed the lowest potential drop across the reaction chamber 42F (25 V/cm for 1.0 kV applied to the microchip) and highest across the separation channel 34F (300 V/cm for 1.0 kV applied to the microchip) without significant bleeding of the product into the separation channel when using the gated injection scheme. The voltage divider used to establish the potentials applied to each of the reservoirs had a total resistance of  $100\text{M}\Omega$  with  $10\text{M}\Omega$  divisions. The analyte from the first reservoir 12F and the reagent from the second reservoir 14F are electroosmotically pumped into the reaction chamber 42F with a volumetric ratio of 1:1.06. Therefore, the solutions from the analyte and reagent reservoirs 12F, 14F are diluted by a factor of  $\approx 2$ . Buffer was simultaneously pumped by electroosmosis from the buffer reservoir 16 toward the analyte waste and waste reservoirs 18F, 20F. This buffer stream prevents the newly formed product from bleeding into the separation channel 34F.

Preferably, a gated injection scheme, described above with respect to FIG. 3, is used to inject effluent from the reaction chamber 42F into the separation channel 34F. The potential at the buffer reservoir 16F is simply floated for a brief period of time (0.1 to 1.0 s), and sample migrates into the separation channel 34F. To break off the injection plug, the potential at the buffer reservoir 16F is reapplied. The length of the injection plug is a function of both the time of the injection and the electric field strength. With this configuration of applied potentials, the reaction of the amino acids with the OPA continuously generates fresh product to be analyzed.

A significant shortcoming of many capillary electrophoresis experiments has been the poor reproducibility of the injections. Here, because the microchip injection process is

computer controlled, and the injection process involves the opening of a single high voltage switch, the injections can be accurately timed events. FIG. 26 shows the reproducibility of the amount injected (percent relative standard deviation, % *rsd*, for the integrated areas of the peaks) for both arginine and glycine at injection field strengths of 0.6 and 1.2 kV/cm and injection times ranging from 0.1 to 1.0 s. For injection times greater than 0.3 s, the percent relative standard deviation is below 1.8%. This is comparable to reported values for commercial, automated capillary electrophoresis instruments. However, injections made on the microchip are  $\approx 100$  times smaller in volume, e.g. 100 pL on the microchip versus 10 nL on a commercial instrument. Part of this fluctuation is due to the stability of the laser which is  $\approx 0.6\%$ . For injection times  $> 0.3$  s, the error appears to be independent of the compound injected and the injection field strength.

FIG. 27 shows the overlay of three electrophoretic separations of arginine and glycine after on-microchip pre-column derivatization with OPA with a separation field strength of 1.8 kV/cm and a separation length of 10 mm. The separation field strength is the electric field strength in the separation channel 34F during the separation. The field strength in the reaction chamber 42F is 150 V/cm. The reaction times for the analytes is inversely related to their mobilities. e.g., for arginine the reaction time is 4.1 s and for glycine the reaction time is 89 s. The volumes of the injected plugs were 150 and 71 pL for arginine and glycine, respectively, which correspond to 35 and 20 fmol of the amino acids injected onto the separation channel 34F. The gated injector allows rapid sequential injections to be made. In this particular case, in analysis could be performed every 4 s. The observed electrophoretic mobilities for the compounds are determined by a linear fit to the variation of the linear velocity with the separation field strength. The slopes were 29.1 and 13.3 mm<sup>2</sup>/(kV·s) for arginine and glycine, respectively. No evidence of Joule heating was observed as indicated by the linearity of the velocity versus field strength data. A linear fit produced correlation coefficients of 0.999 for arginine and 0.996 for glycine for separation field strength from 0.2 to 2.0 kV/cm.

With increasing potentials applied to the microchip Laboratory system 10F, the field strengths in the reaction chamber 42F and separation channel 34F increase. This leads to shorter residence times of the reactants in the reaction chamber and faster analysis times for the products. By varying the potentials applied to the microchip, the reaction kinetics can be studied. The variation in amount of product generated with reaction time is plotted in FIG. 28. The response is the integrated area of the peak corrected for the residence time in the detector observation window and photobleaching of the product. The offset between the data for the arginine and the glycine in FIG. 28 is due primarily to the difference in the amounts injected, i.e. different electrophoretic mobilities, for the amino acids. A ten-fold excess of OPA was used to obtain pseudo-first order reaction conditions. The slopes of the lines fitted to the data correspond to the rates of the derivatization reaction. The slopes are 0.13 s<sup>-1</sup> for arginine and 0.11 s<sup>-1</sup> for glycine corresponding to half-times of reaction of 5.1 and 6.2 s, respectively. These half-times of reaction are comparable to the 4 s previously reported for alanine. We have found no previously reported data for arginine or glycine.

These results show the potential power of integrated microfabricated systems for performing chemical procedures. The data presented in FIG. 28 can be produced under computer control within five approximately five minutes consuming on the order of 100 nL of reagents. These results

are unprecedented in terms of automation, speed and volume for chemical reactions.

#### DNA Analysis

To demonstrate a useful biological analysis procedure, a restriction digestion and electrophoretic sizing experiment are performed sequentially on the integrated biochemical reactor/electrophoresis microchip system 10G shown in FIG. 29. The microchip laboratory system 10G is identical to the laboratory system shown in FIG. 25 except that the separation channel 34G of the laboratory system 10G follows a serpentine path. The sequence for plasmid pBR322 and the recognition sequence of the enzyme *Hinf* I are known. After digestion, determination of the fragment distribution is performed by separating the digestion products using electrophoresis in a sieving medium in the separation channel 34G. For these experiments, hydroxyethyl cellulose is used as the sieving medium. At a fixed point downstream in the separation channel 34G, migrating fragments are interrogated using on-chip laser induced fluorescence with an intercalating dye, thiazole orange dimer (TOTO-1), as the fluorophore.

The reaction chamber 42G and separation channel 34G shown in FIG. 29 are 1 and 67 mm long, respectively, having a width at half-depth of 60  $\mu$ m and a depth of 12  $\mu$ m. In addition, the channel walls are coated with polyacrylamide to minimize electroosmotic flow and adsorption. Electropherograms are generated using single point detection laser induced fluorescence detection. An argon ion laser (10 mW) is focused to a spot onto the chip using a lens (100 mm focal length). The fluorescence signal is collected using a 21x objective lens (N.A. = 0.42), followed by spatial filtering (0.6 mm diameter pinhole) and spectral filtering (560 nm bandpass, 40 nm bandwidth), and measured using a photomultiplier tube (PMT). The data acquisition and voltage switching apparatus are computer controlled. The reaction buffer is 10 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, and 50 mM potassium acetate. The reaction buffer is placed in the DNA, enzyme and waste 1 reservoirs 12G, 14G, 18G shown in FIG. 29. The separation buffer is 9 mM Tris-borate with 0.2 mM EDTA and 1% (w/v) hydroxyethyl cellulose. The separation buffer is placed in the buffer and waste 2 reservoirs 16F, 20F. The concentrations of the plasmid pBR322 and enzyme *Hinf* I are 125 ng/ $\mu$ L and 4 units/ $\mu$ L, respectively. The digestions and separations are performed at room temperature (20° C.).

The DNA and enzyme are electrophoretically loaded into the reaction chamber 42G from their respective reservoirs 12G, 14G by application of proper electrical potentials. The relative potentials at the DNA (12G), enzyme (14G), buffer (16G), waste 1 (18G), and waste 2 (20G) reservoirs are 10%, 10% 0.30%, and 100%, respectively. Due to the electrophoretic mobility differences between the DNA and enzyme, the loading period is made sufficiently long to reach equilibrium. Also, due to the small volume of the reaction chamber 42G, 0.7 nL, rapid diffusional mixing occurs. The electroosmotic flow is minimized by the covalent immobilization of linear polyacrylamide, thus only anions migrate from the DNA and enzyme reservoirs 12G, 14G into the reaction chamber 42G with the potential distributions used. The reaction buffer which contains cations required for the enzymatic digestions, e.g. Mg<sup>2+</sup>, is also placed in the waste 1 reservoir 18G. This enables the cations to propagate into the reaction chamber countercurrent to the DNA and enzyme during the loading of the reaction chamber. The digestion is performed statically by removing all electrical potentials after loading the reaction chamber 42G due to the relatively short transit time of the DNA through the reaction chamber.

Following the digestion period, the products are migrated into the separation channel 34F for analysis by floating the

voltages to the buffer and waste 1 reservoirs 16F, 18F. The injection has a mobility bias where the smaller fragments are injected in favor of the larger fragments. In these experiments the injection plug length for the 75-base pair (bp) fragment is estimated to be 0.34 mm whereas for the 1632-bp fragment only 0.22 mm. These plug lengths correspond to 34% and 22% of the reaction chamber volume, respectively. The entire contents of the reaction chamber 42F cannot be analyzed under current separation conditions because the contribution of the injection plug length to the plate height would be overwhelming.

Following digestion and injection onto the separation channel 34F, the fragments are resolved using 1.0% (w/v) hydroxyethyl cellulose as the sieving medium. FIG. 30 shows an electropherogram of the restriction fragments of the plasmid pBR322 following a 2 min digestion by the enzyme Hinf I. To enable efficient on-column staining of the double-stranded DNA after digestion but prior to interrogation, the intercalating dye, TOTO-1 (1  $\mu$ M), is placed in the waste 2 reservoir 20G only and migrates countercurrent to the DNA. As expected, the relative intensity of the bands increases with increasing fragment size because more intercalation sites exist in the larger fragments. The unresolved 220/221 and 507/511-bp fragments having higher intensities than adjacent single fragment peaks due to the band overlap. The reproducibility of the migration times and injection volumes are 0.55 and 3.1% relative standard deviation (%/rsd), respectively, for 5 replicate analyses.

This demonstration of a microchip laboratory system 10G that performs plasmid DNA restriction fragment analysis indicates the possibility of automating and miniaturizing more sophisticated biochemical procedures. This experiment represents the most sophisticated integrated microchip chemical analysis device demonstrated to date. The device mixes a reagent with an analyte, incubates the analyte/reagent mixture, labels the products, and analyzes the products entirely under computer control while consuming 10,000 times less material than the typical small volume laboratory procedure.

In general, the present invention can be used to mix different fluids contained in different ports or reservoirs. This could be used for a liquid chromatography separation experiment followed by post-column labeling reactions in which different chemical solutions of a given volume are pumped into the primary separation channel and other reagents or solutions can be injected or pumped into the stream at different times to be mixed in precise and known concentrations. To execute this process, it is necessary to accurately control and manipulate solutions in the various channels.

#### Pre-/Post-Separation Reactor System

FIG. 31 shows the same six port microchip laboratory system 10 shown in FIG. 1, which could take advantage of this novel mixing scheme. Particular features attached to the different ports represent solvent reservoirs. This laboratory system could potentially be used for a liquid chromatography separation experiment followed by post-column labeling reactions. In such an experiment, reservoirs 12 and 14 would contain solvents to be used in a liquid chromatography solvent programming type of separation, e.g., water and acetonitrile.

The channel 34 connected to the waste reservoir 2) and to the two channels 26 and 28 connecting the analyte and solvent reservoirs 12 and 14 is the primary separation channel, i.e., where the liquid chromatography experiment would take place. The intersecting channels 30, 32 connect-

ing the buffer and analyte waste reservoirs 16 and 18 are used to make an injection into the liquid chromatography or separation channel 34 as discussed above. Finally, reservoir 22 and its channel 36 attaching to the separation channel 34 are used to add a reagent, which is added in proportions to render the species separated in the separation channel detectable.

To execute this process, it is necessary to accurately control and manipulate solutions in the various channels. The embodiments described above took very small volumes of solution ( $\approx 100$  pl) from reservoirs 12 and 40 and accurately injected them into the separation channel 34. For these various scenarios, a given volume of solution needs to be transferred from one channel to another. For example, solvent programming for liquid chromatography or reagent addition for post-column labeling reactions requires that streams of solutions be mixed in precise and known concentrations.

The mixing of various solvents in known proportions can be done according to the present invention by controlling potentials which ultimately control electroosmotic flows as indicated in equation 1. According to equation 1 the electric field strength needs to be known to determine the linear velocity of the solvent. In general, in these types of fluidic manipulations a known potential or voltage is applied to a given reservoir. The field strength can be calculated from the applied voltage and the characteristics of the channel. In addition, the resistance or conductance of the fluid in the channels must also be known.

The resistance of a channel is given by equation 2 where R is the resistance,  $\rho$  is the resistivity, L is the length of the channel, and A is the cross-sectional area.

$$R_i = \frac{\rho L_i}{A_i} \quad (2)$$

Fluids are usually characterized by conductance which is just the reciprocal of the resistance as shown in equation 3. In equation 3, K is the electrical conductance,  $\kappa$  is the conductivity, A is the cross-sectional area, and L is the length as above.

$$K_i = \frac{\kappa_i A_i}{L_i} \quad (3)$$

Using ohms law and equations 2 and 3 we can write the field strength in a given channel, i, in terms of the voltage drop across that channel divided by its length which is equal to the current,  $I_i$  through channel i times the resistivity of that channel divided by the cross-sectional area as shown in equation 4.

$$E_i = \frac{V_i}{L_i} = \frac{I_i \rho_i}{A_i} = \frac{I_i}{\kappa_i A_i} \quad (4)$$

Thus, if the channel is both dimensionally and electrically characterized, the voltage drop across the channel or the current through the channel can be used to determine the solvent velocity or flow rate through that channel as, expressed in equation 5. It is also noted that fluid flow depends on the zeta potential of the surface and thus on the chemical make-ups of the fluid and surface.

$$V_i \propto I_i \propto \text{Flow}$$

Obviously the conductivity,  $\kappa$ , or the resistivity,  $\rho$ , will depend upon the characteristics of the solution which could vary from channel to channel. In many CE applications the characteristics of the buffer will dominate the electrical

characteristics of the fluid, and thus the conductance will be constant. In the case of liquid chromatography where solvent programming is performed, the electrical characteristics of the two mobile phases could differ considerably if a buffer is not used. During a solvent programming run where the mole fraction of the mixture is changing, the conductivity of the mixture may change in a nonlinear fashion but it will change monotonically from the conductivity of the one neat solvent to the other. The actual variation of the conductance with mole fraction depends on the dissociation constant of the solvent in addition to the conductivity of the individual ions.

As described above, the device shown schematically in FIG. 31 could be used for performing gradient elution liquid chromatography with post-column labeling for detection purposes, for example. FIG. 31(a), 31(b), and 31(c) show the fluid flow requirements for carrying out the tasks involved in a liquid chromatography experiment as mentioned above. The arrows in the figures show the direction and relative magnitude of the flow in the channels. In FIG. 31(a), a volume of analyte from the analyte reservoir 16 is loaded into the separation intersection 40. To execute a pinched injection it is necessary to transport the sample from the analyte reservoir 16 across the intersection to the analyte waste reservoir 18. In addition, to confine the analyte volume, material from the separation channel 34 and the solvent reservoirs 12, 14 must flow towards the intersection 40 as shown. The flow from the first reservoir 12 is much larger than that from the second reservoir 14 because these are the initial conditions for a gradient elution experiment. At the beginning of the gradient elution experiment, it is desirable to prevent the reagent in the reagent reservoir 22 from entering the separation channel 34. To prevent such reagent flow, a small flow of buffer from the waste reservoir 20 directed toward the reagent channel 36 is desirable and this flow should be as near to zero as possible. After a representative analyte volume is presented at the injection intersection 40, the separation can proceed.

In FIG. 31(b), the run (separation) mode is shown, solvents from reservoirs 12 and 14 flow through the intersection 40 and down the separation channel 34. In addition, the solvents flow towards reservoirs 4 and 5 to make a clean injection of the analyte into the separation channel 34. Appropriate flow of reagent from the reagent reservoir 22 is also directed towards the separation channel. The initial condition as shown in FIG. 31(b) is with a large mole fraction of solvent 1 and a small mole fraction, of solvent 2. The voltages applied to the solvent reservoirs 12, 14 are changed as a function of time so that the proportions of solvents 1 and 2 are changed from a dominance of solvent 1 to mostly solvent 2. This is shown in FIG. 31(c). The latter monotonic change in applied voltage effects the gradient elution liquid chromatography experiment. As the isolated components pass the reagent addition channel 36, appropriate reaction can take place between this reagent and the isolated material to form a detectable species.

FIG. 32 shows how the voltages to the various reservoirs are changed for a hypothetical gradient elution experiment. The voltages shown in this diagram only indicate relative magnitudes and not absolute voltages. In the loading mode of operation, static voltages are applied to the various reservoirs. Solvent flow from all reservoirs except the reagent reservoir 22 is towards the analyte waste reservoir 18. Thus, the analyte reservoir 18 is at the lowest potential and all the other reservoirs are at higher potential. The potential at the reagent reservoir should be sufficiently below that of the waste reservoir 20 to provide only a slight

flow towards the reagent reservoir. The voltage at the second solvent reservoir 14 should be sufficiently great in magnitude to provide a net flow towards the injection intersection 40, but the flow should be a low magnitude.

In moving to the run (start) mode depicted in FIG. 31(b), the potentials are readjusted as indicated in FIG. 32. The flow now is such that the solvent from the solvents reservoirs 12 and 14 is moving down the separation channel 34 towards the waste reservoir 20. There is also a slight flow of solvent away from the injection intersection 40 towards the analyte and analyte waste reservoirs 16 and 18 and an appropriate flow of reagent from the reagent reservoir 22 into the separation channel 34. The waste reservoir 20 now needs to be at the minimum potential and the first solvent reservoir 12 at the maximum potential. All other potentials are adjusted to provide the fluid flow directions and magnitudes as indicated in FIG. 31(b). Also, as shown in FIG. 32, the voltages applied to the solvent reservoirs 12 and 14 are monotonically changed to move from the conditions of a large mole fraction of solvent 1 to a large mole fraction of solvent 2.

At the end of the solvent programming run, the device is now ready to switch back to the inject condition to load another sample. The voltage variations shown in FIG. 32 are only to be illustrative of what might be done to provide the various fluid flows in FIGS. 31(a)–(c). In an actual experiment some of the various voltages may well differ in relative magnitude.

While advantageous embodiments have been chosen to illustrate the invention, it will be understood by those skilled in the art that various changes and modifications can be made therein without departing from the scope of the invention as defined in the appended claims.

I claim:

1. A microchip laboratory system for analyzing or synthesizing chemical material, comprising:

a body having disposed therein, a plurality of integrated channels connecting a plurality of at least five reservoirs, at least one reservoir having at least a first material disposed therein, and each of at least five of the reservoirs simultaneously having separate controlled electrical potentials associated therewith, said electrical potentials presenting a voltage gradient between one reservoir and at least one other reservoir, to transport said first material from said at least one other reservoir through at least one of the plurality of integrated channels toward at least one of the other reservoirs to expose said first material to one or more selected chemical or physical environments.

2. The system of claim 1, wherein said first material is a fluid.

3. The system of claim 1, wherein said plurality of integrated channels comprises:

at least three of said plurality of integrated channels in fluid communication at a first intersection, each of said at least three channels connecting said first intersection with a separate one of at least three of the reservoirs; and

wherein said electrical potentials simultaneously associated with said at least three reservoirs simultaneously transport materials from at least two of the reservoirs to the first intersection, to mix the materials from the at least two reservoirs at the first intersection.

4. The system of claim 3, wherein an electrical potential at the first intersection is less than the electrical potential associated with each of the at least two reservoirs.

5. The system of claim 1, wherein said plurality of integrated channels comprises:

at least first, second, third, and fourth channels in fluid communication at a first intersection, said first, second, third, and fourth channels connecting first, second, third and fourth reservoirs to said intersection respectively; and wherein said electrical potential controls the volume of a first material transported from the first reservoir to the second reservoir through the first intersection by transporting a second material from the third reservoir through the first intersection.

6. The system of claim 5, wherein the electrical potential selectively transports the second material from the third reservoir through the first intersection toward the second or fourth reservoirs.

7. The system of claim 5, wherein the electrical potentials transport the second material through the first intersection preventing the first material from moving through the first intersection toward the second reservoir, after a selected volume of the first material has passed the first intersection toward the second reservoir.

8. The system of claim 5, wherein the electrical potentials transport the first and second materials into the first intersection and toward the second reservoir.

9. The system of claim 1, wherein the plurality of integrated channels comprises:

a first channel connecting a first and a second of said at least five reservoirs, a second channel connecting a third and a fourth of said at least five reservoirs the first channel and the second channel intersecting at a first intersection; and

a third channel connecting a fifth of the at least five reservoirs, with the second channel at a location between the first intersection and the fourth reservoir.

10. The system of claim 9, wherein said electrical potentials simultaneously transport material from the fifth reservoir and material from the first intersection toward the fourth reservoir, to mix the materials from the first intersection and the fifth reservoir.

11. The system of claim 9 wherein the third channel connects the fifth reservoir with a sixth reservoir, the third channel intersecting the second channel; at a second intersection the second intersection being located at a point on the third channel between the fifth and sixth reservoirs.

12. The system of claim 11, wherein the electrical potentials simultaneously transport material from the fifth and sixth reservoirs into the second intersection.

13. The system of claim 12, wherein the electrical potentials transport material from the fifth and sixth reservoirs through the second intersection toward the first intersection and toward the fourth reservoir, after a selected volume of material from the first intersection is transported through the second intersection toward the fourth reservoir.

14. A microchip flow system, comprising:

a body having first and second channels disposed therein the first channel connecting first and second reservoirs, the first reservoir having a first material disposed therein, and the second channel connecting third and fourth reservoirs, the first channel intersecting the second channel at a point on the first channel between the first and second reservoirs to form a first intersection, and in which at least three of the reservoirs simultaneously have controlled electrical potentials associated therewith said electrical potentials effecting transport of a volume of first material from the first reservoir to the second reservoir through the first intersection, said volume being selectively controlled by the movement of a material from the third reservoir through the first intersection toward another reservoir.

15. The system of claim 14 wherein the first material is a fluid.

16. The system of claim 14 wherein the electrical potentials transport a second material from the third reservoir through the first intersection toward the second reservoir.

17. The system of claim 15 wherein the electrical potentials transport the second material from the third reservoir through the first intersection toward the fourth reservoir preventing the first material from moving through the first intersection toward the second reservoir after a selected volume of the first material has passed through the first intersection toward the second reservoir.

18. The system of claim 15 electrical potentials simultaneously transport the first and second materials from the first intersection toward the second reservoir.

19. The system of claim 14 further comprising a third channel that connects a fifth reservoir with the first channel at a location between the first intersection and the second reservoir.

20. The system of claim 19, further comprising: an additional electrical potential associated with the fifth reservoir, the additional electrical potential transporting material from the fifth reservoir with material transported from the first intersection toward the second reservoir.

21. The system of claim 19, further comprising a sixth reservoir having a controlled electrical potential associated therewith, the third channel connecting the fifth and sixth reservoirs and crossing the first channel at a second intersection between the fifth and sixth reservoirs.

22. The system of claim 21, further wherein the electrical potentials simultaneously transport material from the fifth and sixth reservoirs into the second intersection.

23. The system of claim 21, wherein the electrical potentials simultaneously transport material from the fifth and sixth reservoirs through the second intersection and toward the second reservoir.

24. A microflow control system, comprising a body having integrated channels connecting at least four reservoirs, wherein first and second reservoirs of the four reservoirs contain first and second materials, respectively, a channel connecting the first reservoir and a third reservoir forming an intersection with a channel connecting the second and a fourth reservoir; and

a voltage controller that:

applies an electrical potential difference between the first reservoir and the third reservoir, and selectively applies a potential difference between the second and fourth reservoirs or the second and third reservoirs to transport a selected, variable volume of the first material from the first reservoir through the intersection toward the third reservoir.

25. A method of controlling the flow of material through an interconnected channel system having at least first and second channels and at least four reservoirs, the first channel connecting first and third reservoirs and the second channel connecting second and fourth reservoirs, wherein the first reservoir contains a first material, the first channel intersecting the second channel at a first intersection between the first and third reservoirs, the method comprising:

applying an electrical potential difference between the first reservoir and the third reservoir in a manner that transports a selected, variable volume of the first material from the first reservoir through the intersection toward the third reservoir; and

after a selected time period, simultaneously applying a selected electrical potential to each of at least three of the four reservoirs in a manner that inhibits the movement of the first material through the intersection toward the third reservoir.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
**CERTIFICATE OF CORRECTION**

PATENT NO. : 5,858,195  
DATED : January 12, 1999  
INVENTOR(S) : J. Michael Ramsey

Page 1 of 1

It is certified that error appears in the above-identified patent and that said Letters Patent is hereby corrected as shown below:

Column 35, claim 13.

Line 47, "firth" should be -- fifth --;

Column 36, claim 18.

Line 11, after "claim15" insert -- wherein the --;

Column 36, claim 21.

Line 27, "firth" should be -- fifth --;

Signed and Sealed this

Twelfth Day of March, 2002

Attest:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "James E. Rogan", with a horizontal line drawn underneath it.

Attesting Officer

JAMES E. ROGAN  
Director of the United States Patent and Trademark Office